



Étude des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'expression de SMN dans des modèles murins d'Amyotrophie Spinale Infantile

Julien Branchu

► To cite this version:

Julien Branchu. Étude des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'expression de SMN dans des modèles murins d'Amyotrophie Spinale Infantile. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T058 . tel-01124090

HAL Id: tel-01124090

<https://theses.hal.science/tel-01124090>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

École Doctorale 158 Cerveau Cognition Comportement
Discipline : neurobiologie
Spécialité : biologie cellulaire et génétique

Thèse de doctorat présentée par
M. Julien Branchu
en vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Paris Descartes

Étude des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'expression de SMN dans des modèles murins d'Amyotrophie Spinale Infantile

Soutenu publiquement le 12 décembre 2012 devant le jury suivant :

Président du jury : Pr. François Couraud
Rapporteur : Dr. Brigitte Pettman
Rapporteur : Pr. Laurent Schaeffer
Examinatrice : Dr. Sophie Nicole
Directeur de thèse : Pr. Frédéric Charbonnier



REMERCIEMENTS

Voilà la seule partie où mon franc-parler va pouvoir resurgir, sans pour autant entacher le style très académique du manuscrit de thèse. Je ne tenais pas spécialement à faire des remerciements formels, guindés et vides de toute substance émotionnelle donc je vais laisser parler mon cœur. Il ne faudra pas vous étonner si cela ressemble à une tentative de record du monde du plus grand nombre de merci dans un texte de trois pages. Je tiens à m'excuser d'avance si quelques fautes d'orthographe subsistent et écorchent vos cornées ; ce texte, devant être révélé le jour J, n'a été relu et corrigé que par son humble auteur.



Une myriade de noms scintille déjà dans ma tête au grand dam des rapporteurs qui vont surement sauter quelques pages dans... trois, deux, un, maintenant ?

Je tiens à exprimer un immense (et le mot n'est pas encore assez grand) merci à mes parents, [Pat](#) et [JP](#) sans qui je ne serais pas là (eh oui !). Pour leur soutien indéfectible, leur écoute, leur patience, l'œil du tigre qu'ils m'ont transmis ; je vous dois tellement. Je ne vous le dirais jamais assez... Une petite pensée pour [ma Kat](#) et [mon André](#), mes grands-parents, partis explorés les étoiles il y a quelques années. Je me plais à penser que vous auriez été fiers de moi.

Au sein du vaste monde de la science et de la recherche, je tiens à remercier le Dr. [Christel Becker](#) pour m'avoir sorti la phrase « c'est bien, tu es très rigoureux, tu devrais faire de la recherche ». Quelques mots en TP de neurosciences qui ont, somme toute, changé ma vie. Merci à toi et au Pr. [Jean-Jacques Benoliel](#) pour m'avoir accueilli en stage pendant l'été 2007, m'avoir fait confiance et donné des responsabilités. J'ai tellement appris au contact d'[Yvonne](#), [Elias](#), [Michel](#), [Elisa](#), [Brigitte](#) et bien sûr [Aurélien](#) et [Cyril](#). Scientifiquement et humainement, bon de géant !

Au sein du CEsEM (quitte à déclencher les foudres des adeptes de la hiérarchie et du protocole) je tiens à adresser, en premier lieu, mes plus sincères remerciements au Pr. [Frédéric Charbonnier](#). Tu mérites bien ton statut de grand maître scarabée ! Son esprit visionnaire qui lui confère toujours 10 longueurs d'avance, ses conseils ô combien judicieux et sa confiance renouvelée m'ont permis d'appréhender cette thèse dans les meilleures conditions. J'ai pu assurément accéder à une autre dimension de la recherche grâce aux congrès où tu m'as entraîné, aux rôles que tu m'as régulièrement laissés et tous les défis que tu m'as invité à relever. En plus de m'avoir donné tous les moyens de réaliser et réussir cette thèse, je te suis très reconnaissant de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner dans la Fac où j'ai fait mes études (la boucle est bouclée) et encadrer une galaxie de stagiaires.

En second lieu, je voudrais exprimer ma profonde gratitude envers mon collègue et ami, le Dr. [Olivier Biondi](#). En des temps reculés (lui, à quelques semaines de soutenir sa thèse, moi, en fin de M1 et les dinosaures qui gambadaient encore), il m'a pris sous son aile et m'a transmis en un temps record un grand nombre de savoirs techniques et théoriques. Je garde un super souvenir de cette époque où nous courrions partout pour me présenter à tout le monde, faire huit manips en même temps, débusquer des produits dans tous les recoins... avec ça, j'étais paré à toute épreuve ! Ta passion, ton énergie et ta bonne humeur sont, pour moi, le moteur de notre équipe. C'est un plaisir de bosser avec un mec comme toi au quotidien, chapeau bas ! [Ghjuvan Ghjacumu](#)

Maintenant les X-Men... pffff,  je pleure comme un  devant mon PC à l'idée de ne plus bosser avec vous làààà. Je mesure la chance de vous avoir côtoyé pendant ces 3 ans de thèse. Merci à [Shackleford](#) pour son pragmatisme anglais,

sa grande clairvoyance, sa disponibilité et son accent corse à couper au couteau (à châtaignes). « Autant » on rencontre qu'une seule fois dans sa vie un type en or comme toi ! Merci au Dr. [Delphine Meffre](#), alias Maîtresse-Miss-Mousse-Coco-Bijou-Boudin-Garou-de-la-jungle, pour avoir la patience et la gentillesse de nous supporter, sa bonne humeur et son très grand professionnalisme. Una vez más, muchas gracias la Espuma ! Merci au Dr. [Julien Grenier](#), « comme un grenier ». Une fois qu'il se laisse approcher, on découvre un type bourré (ne t'inquiète pas, il y a une suite...) d'excellentes idées, de générosité et d'humour. Tu as toujours l'approche que les autres n'ont pas, c'est une force ! Merci au Dr. [Bruno Elpidio Della Gaspera](#), une source de savoir scientifique intarissable, pour son ingéniosité mais aussi ses digressions, ses rythmes endiablés, ses supeeer mimes et ses danses improbables. Un big-Up à [Mehdi Hichor](#) pour ses blagues décapantes, sa culture, sa reconnaissance et ses performances à la batterie dans le groupe Trust ! Tu es l'apprenti de ce petit groupe mais je te prédis un grand avenir. Enfin, un merci géantissime au Dr. [Martin Belle](#) pour nos discussions enrichissantes, ton volontarisme, ta soif de renouvellement, les nombreux périples, les matchs de pachole ouzbèke, les poulets et les fruits que tu nous prépares au mini couteau suisse et qu'en est-il de tes expressions chanmax ?

Je souhaite également témoigner ma gratitude au reste des membres des équipes « trois Cha- ». [Farah Chali](#), pour sa passion des neurosciences, son implication, son calme olympien et son sourire radieux quand je plaisante ou fredonne dans le bureau. [Amina Ben Salah](#), pour sa richesse d'esprit, sa persévérance, avoir décidé de refermer les boîtes de cônes et les douze tonnes de hlous qu'elle m'a gentiment rapporté en quatre ans. Le Dr. [Philippe Lopes](#), pour son formidable enthousiasme, para nossas discussões em português et sa volonté impavide de nous faire progresser en anglais. Le Dr. [Claude Pariset](#), pour son humour subtile dans les langues de Molière et Shakespeare et m'avoir donné carte blanche lors de l'UE de signa que nous avons animé trois ans de suite. [Céline Deseilles](#), pour sa constance, son aide dans les suivis à l'animalerie et la confection de la ribambelle de petites solutions. Le Pr. [Christophe Chanoine](#) et le Dr. [Anne-Sophie Armand](#) pour leurs conseils constructifs à mes débuts et l'initiation aux thés les plus transcendants. [Sylvie Lécolle](#) pour son écoute et la surveillance de notre hygiène et de notre sécurité. [Joël Coppet](#) pour son travail de l'ombre et sa fameuse phrase matinale accompagnée d'un cappuccino « t'as du courage de démarrer aussi tôt ; tu deviendras quelqu'un ». Le Dr. [Sophie Bernard](#) (bon anniversaire Sophie !) pour ses plaisanteries quotidiennes et m'avoir accordé son temps précieux afin de démystifier un peu de physique ; ce qui n'est pas trivial... Le Dr. [Françoise Courtin](#) pour ses anecdotes de KB, le matos de pointe qu'elle nous a ramené et ses grands éclats de rire. [Julia Montanaro](#) pour son aide inestimable à l'animalerie et sur anibio. Le Pr. [Mehrnaz Jafarian-Tehrani](#) et le Dr. [Emeline Camand](#) pour leur discrétion et leur amabilité. [Gemma Llufriu-Dabén](#), l'unique fan d'El Gato Cosmico, pour sa sympathie et son entrain immuables. Enfin merci du fond du cœur à tout le cartel libanais, le Pr. [Charbel Massaad](#), pour ses innombrables qualités humaines ; le Dr. [Joelle Makoukji](#), pour m'avoir transmis la maîtrise des ChIPs, le Dr. [Ronza Abdel Rassoul](#), pour son petit côté joyeux et son humour... parfois involontaire ; [Nissrine Daou](#), pour sa gentillesse et le courage dont elle fait preuve ; [Sarah Zahra](#), pour les knefehs et noooooon je ne l'ai pas oublié, [Walid Abi Habib](#), mon professeur improvisé de libanais.

Bien évidemment, je tiens à remercier le Dr. [Pierre-Paul Vidal](#), roi du CEsEM, pour m'avoir accepté au sein de l'unité et préparé pendant 5 heures, juste avant mon concours de bourse de thèse. Sans cela, cette aventure aurait-elle commencé ?

Cette thèse fut aussi l'occasion de croiser transitoirement de nombreuses personnes. Je tiens à exprimer mes remerciements envers ceux qui ont apporté leur aide à la réalisation de cette belle histoire. Le Dr. [Séverine Deforges](#), pour m'avoir toujours soutenu dans les moments difficiles, transmis plein de petites astuces et le métier de maître-nageur sauveteur de souris (« nage boudin ! »). [Sophie Beaune](#), ma toute première pote de labo, pour sa sagacité, ses anecdotes et m'avoir présenté son sacré phénomène : [Marc](#), maître de la

sphère g33k (Tek'ma'te !). [Marielle Saclier](#), ma super coloc', pour sa bonne humeur et être toujours la première pour la déconne, les sorties et faire avancer la science le weekend. [Camille Lancelin](#), ma binôme complice de labo, pour ses 10⁵ immunos, les photos de pétoncles et son grand cœur. Ce fut un réel plaisir de bosser avec toi ; j'espère que ça se reproduira ! [Perrine Delers](#) pour les conversations matinales fort agréables et m'avoir enseigné les bases de la culture cellulaire. La société secrète des thésards de Paris V : [Séverine S](#), [Jennifer](#), [Piou-piou](#), [William](#), [Cyril](#), [Stéphanie](#), [Visou](#), [François](#), [Marine](#), [Ludmilla](#) et surtout [Aline](#), avec qui j'ai fait une course endiablée à la thèse « ♪ I'm on the highway to hell ». Dans la fournée d'étudiants de 2009 : le trio [Lucie-Julie-Audrey](#), [Christelle](#) la magicienne slovaque, l'énigmatique [Dounia](#), [Caroline](#), la pétillante [Stéphy](#), [Mikaël](#) et ses Yops. Dans la fournée d'étudiants de 2010 : [Diane](#) et ses plantes, [Hovanès](#) le nouveau Mozart, [Geoffroy](#) le gueux et la sémillante petite-[Céline](#). Dans la fournée d'étudiants de 2011 : l'excellentissime [Florine](#), mon padawan [Alexis](#), [Ylenia](#), [Alexandre](#) et ses flans coco. Dans la fournée d'étudiants de 2012 : [Marie](#), [Tobias](#), [Léo](#), [Romane](#) et mon petit cyborg canadien [Andréanne](#) « tantôt ». Merci aux membres de la sphère SMA : les Drs. [Christian Lorson](#), [Mendell Rimmer](#), [Laxman Gangwani](#), [Monica Nizzardo](#), [Dario Ronchi](#), [Stefania Corti](#), [Claudia Fallini](#), [Wilfried Rossoll](#) et [Suzie Lefebvre](#) pour les discussions très enrichissantes et [Alexis](#) et [Julia](#), atteints de SMA de type II, venus partager leurs expériences et leur quotidien.

La fin de cette avalanche de compliments est imminente ; je me dois de remercier mes amis qui ont supporté, et parfois compris, mon humeur fluctuante et ma disparition pour la finalisation de ce manuscrit. D'une part, merci à [Laura](#), la fée de la créativité, la sœur que je n'ai jamais eu ; [Romain](#), un géant envoyé parmi les hommes pour les apaiser et les faire rire, du coup, le beau-frère que je n'ai jamais eu... et tout le reste de la clique : super-[Elsa](#) la conceptrice de génie des invitations, [Sabrina](#), [Anto](#), [Rion](#), [Flo](#), [Matt](#), [Laury](#), [Fred](#) et [Hervé](#). D'autre part, merci à l'exceptionnelle famille Bedin et ses satellites : [David](#) le meilleur ami qu'un homme puisse rêver d'avoir, déjà 11 années d'amitié sans faille et encore beaucoup d'autres, you rock !, [Isa](#), [Chris](#), [Alice](#), [Emilie](#), [Juju](#) le zinc blindé, [Mika](#) et [Cyndie](#). Merci également à [Sonia](#) et [Anne](#), mes deux acolytes de master, pour m'avoir sauvé la mise plus d'une fois ! Je souhaite conclure ce paragraphe par un immense merci à ma belle [Manon](#) pour ses encouragements quotidiens et à la famille Artoré pour m'avoir adopté très rapidement.

Enfin, je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse ; doublement même s'ils ont eu le courage de lire ce pavé. Merci au Pr. [François Couraud](#), directeur de l'école doctorale Cerveau Cognition Comportement, d'avoir toujours été à mon écoute, d'avoir suivi l'évolution de mon travail et accepté de présider mon jury de soutenance de thèse. Merci au Dr. [Brigitte Pettman](#), au Pr. [Laurent Schaeffer](#) et au Dr. [Sophie Nicole](#) pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail, dans de plus brefs délais, en qualité de rapporteurs et d'examinatrice.

TABLE DES MATIÈRES

p 10	LISTE DES ILLUSTRATIONS
p 11	LISTE DES TABLEAUX
p 13	PRÉAMBULE
p 15	INTRODUCTION
p 15	1. Les amyotrophies spinales
p 15	1.1. Historique
p 16	1.2. Caractéristiques et classification
p 17	1.2.1. La SMA de type I
p 19	1.2.2. La SMA de type II
p 19	1.2.3. La SMA de type III
p 20	1.2.4. La SMA de type IV
p 20	1.3. Epidémiologie
p 20	1.3.1. Incidence
p 21	1.3.2. Prévalence
p 21	1.3.3. Porteurs hétérozygotes de la mutation du gène <i>SMN</i>
p 21	1.3.4. Répartition par sexe
p 22	1.4. Aspects génétiques
p 22	1.4.1. Gènes <i>SMN1</i> et <i>SMN2</i>
p 27	1.4.2. Structure du promoteur
p 28	1.4.3. Modulation de la sévérité de la SMA
p 29	1.4.4. Gènes <i>NAIP</i> et <i>p44</i>
p 30	1.5. Structure et fonction de la protéine SMN
p 30	1.5.1. Structure de SMN
p 32	1.5.2. Expression tissulaire et cellulaire
p 33	1.5.3. Expression dans le temps
p 34	1.5.4. Partenaires et fonctions de SMN
p 34	1.5.4.1. Assemblage des snRNP
p 37	1.5.4.2. Maturation des ARN messagers
p 37	1.5.4.3. Transcription
p 37	1.5.4.4. Transport axonal et modification du cytosquelette
p 39	1.5.4.5. Autres rôles
p 40	1.6. Diagnostic et prises en charge des symptômes
p 40	1.6.1. Diagnostic
p 40	1.6.2. Prises en charge
p 40	1.7. Approches thérapeutiques et traitements cliniques
p 42	1.7.1. Augmentation de l'expression de <i>SMN2</i>
p 42	1.7.1.1. Les composés régulant l'acétylation et/ou la méthylation
p 43	1.7.1.2. Autres substances
p 44	1.7.2. Modification de l'épissage alternatif
p 44	1.7.2.1. Les inhibiteurs d'HDACs
p 44	1.7.2.2. Les petits ARN antisens
p 44	1.7.2.3. Autres substances
p 45	1.7.3. Traduction et stabilisation de la protéine SMN
p 45	1.7.4. Thérapies géniques et cellulaires
p 46	1.7.5. Neuroprotection
p 47	1.7.6. Autres stratégies
p 47	1.8. Modèles animaux
p 47	1.8.1 Modèles souris
p 49	1.8.1.1. Les Modèles de Burghes
p 50	1.8.1.2. Le Modèle de Hung Li
p 51	1.8.1.3. Les stratégies <i>Cre-loxP</i>

p 53	1.8.2. Autres modèles animaux
p 55	2. Amyotrophie spinale et exercice physique
p 55	2.1. Bienfaits de l'exercice physique
p 56	2.2. Unité motrice
p 57	2.2.1. Fibres musculaires
p 57	2.2.1.1. Structure et développement
p 59	2.2.1.2. Fibres musculaires et SMA
p 59	2.2.1.3. Modifications induites par l'exercice
p 60	2.2.2. Jonctions neuromusculaires
p 60	2.2.2.1. Structure et développement
p 62	2.2.2.2. Jonctions neuromusculaires et SMA
p 62	2.2.2.3. Modifications induites par l'exercice
p 63	2.2.3. Motoneurones
p 63	2.2.3.1. Structure et développement
p 63	2.2.3.2. Motoneurones et SMA
p 64	2.2.3.3. Modifications induites par l'exercice
p 65	2.3. Récepteur au NMDA
p 65	2.3.1. Structure
p 67	2.3.2. Expression développementale
p 68	2.3.3. Activité pro- ou anti-apoptotique
p 69	2.3.4. Récepteur au NMDA et SMA
p 69	2.3.5. Modifications induites par l'exercice sur les NMDARs
p 69	2.4. Récepteur à l'IGF-1
p 69	2.4.1. L'Insulin-like Growth Factor-1
p 71	2.4.2. Structure d'IGF-1R
p 72	2.4.3. Voie IGF-1 et SMA
p 73	2.4.4. Voie IGF-1 et exercice physique
p 75	PROBLÉMATIQUE
p 77	RÉSULTATS
p 77	3. Article 1
p 79	3.1. Introduction à l'article 1
p 96	3.2. Conclusions de l'article 1
p 97	3.3. Résultats complémentaires à l'article 1
p 97	3.3.1. Transcrits SMN dans les souris mimant la SMA de type II traitées au NMDA de la naissance à 6 jours
p 99	3.3.2. Évaluation de la phosphorylation de Elk-1 dans la moelle épinière lombaire des souris SMA de type I et II traitées au NMDA
p 101	3.3.3. Liaison de p-CREB et p-Elk-1 sur le promoteur de <i>SMN2</i> après traitement au NMDA
p 103	3.3.4. Niveau d'acétylation des histones H3 et H4 sur le promoteur de <i>SMN2</i> après traitement au NMDA
p 104	3.3.5. Matériel et méthodes
p 107	4. Article 2
p 109	4.1. Introduction à l'article 2
p 128	4.2. Conclusions de l'article 2
p 129	4.3. Résultats complémentaires à l'article 2
p 129	4.3.1. Évaluation de l'inhibition de la phosphorylation de ERK par le U0126 et l'AZD6244.
p 131	5. Article 3
p 133	5.1. Introduction à l'article 3
p 151	5.2. Conclusions de l'article 3
p 152	5.3. Résultats complémentaires à l'article 3
p 152	5.3.1. Évaluation de la phosphorylation de CaMKII dans la moelle épinière et les <i>tibialis</i> de souris invalidées partiellement pour l'IGF-1R

p 153 DISCUSSION

- p 153 I. L'activation des récepteurs au NMDA aboutit à une accélération de la maturation de l'unité motrice et à l'augmentation de l'expression de SMN dans la moelle épinière de souris mimant la SMA de type I et de type II
- p 157 II. L'inhibition de la voie MEK/ERK/Elk-1 aboutit à l'augmentation de l'expression de SMN dans la moelle épinière de souris mimant la SMA de type I et dans des myotubes provenant de patients atteints de SMA de type II
- p 155 III. La diminution de moitié des récepteurs à l'IGF-1 aboutit à une accélération de la maturation de l'unité motrice et à l'augmentation de l'expression de SMN dans la moelle épinière de souris mimant la SMA de type II
- p 155 IV. La voie PI3K/AKT/CREB constitue un des acteurs majeurs dans la neuroprotection des motoneurones de la moelle épinière.
- p 157 V. La modulation des voies en compétition MEK/ERK/Elk-1 et PI3K/AKT/CREB peut induire une augmentation de la transcription des transgènes *SMN2* et/ou une modification du profil d'épissage des transcrits provenant de *SMN2*
- p 159 VI. Les voies PI3K/AKT/CREB et MEK/ERK/Elk-1 sont en balance dans la moelle épinière et les muscles SMA. Le blocage spécifique d'un membre d'une des deux voies entraîne l'activation de l'autre voie et vice versa
- p 160 VII. L'induction d'un flux calcique et la phosphorylation de CaMKII réactivent la voie PI3K/AKT/CREB au détriment de la voie MEK/ERK/Elk-1
- p 161 VIII. La voie JAK/STAT3/SOCS, indépendante du calcium, régulerait également la balance entre les voies MEK/ERK/Elk-1 et PI3K/AKT/CREB
- p 162 IX. L'inhibition de la voie MEK/ERK/Elk-1 par l'AZD6244, un médicament actuellement employé dans des essais cliniques, est bénéfique pour les souris mimant la SMA de type I

p 163 PERSPECTIVES

- p 163 I. Analyse de l'effet d'un traitement au NMDA dans le contrôle transcriptionnel ou post-transcriptionnel de l'expression du gène *SMN2*
- p 165 II. Analyse des molécules impliquées dans l'épissage qui pourraient conduire à l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits provenant du gène *SMN2* dans un contexte de SMA
- p 166 III. Analyse des gènes dont l'expression est modulée dans les moelles épinières SMA par l'exercice, une stimulation des NMDARs ou l'invalidation partielle d'IGF-1R à P6 et P12

p 166 IV. Autres perspectives

p 169 BIBLIOGRAPHIE

p 191 ANNEXES

- p 191 6. Liste des Abréviations
- p 193 7. Lexique
- p 195 8. Article 4
- p 197 8.1. Introduction à l'article 4
- p 210 8.2. Conclusions de l'article 4
- p 211 9. Article 5
- p 213 9.1. Introduction à l'article 5
- p 221 9.2. Conclusions de l'article 5
- p 223 10. Article 6
- p 225 10.1. Introduction à l'article 6
- p 246 10.2. Conclusions de l'article 6

LISTE DES ILLUSTRATIONS

- p 15 Figure 1 : l'amyotrophie spinale à travers le temps
- p 15 Figure 2 : postures caractéristiques des enfants atteints de SMA de type I
- p 18 Figure 3 : biopsies musculaires d'enfants atteints de SMA de type I
- p 22 Figure 4 : organisation génomique du locus SMA, région 5q11-q13
- p 24 Figure 5 : structure génomique et différence d'épissage entre les gènes *SMN1* et *SMN2*
- p 25 Figure 6 : diagramme schématique de l'expression des gènes *SMN1* et *SMN2*
- p 26 Figure 7 : épissage des transcrits *SMN1* et *SMN2*
- p 26 Figure 8 : influence de l'épissage de l'exon 7 par le pH extracellulaire
- p 27 Figure 9 : diagramme schématique de la région comprise entre -450 et +300 du promoteur de *SMN2*
- p 28 Figure 10 : acétylation des histones H3 et H4 sur le promoteur et le gène *SMN*
- p 31 Figure 11 : séquence nucléotidique d'ADN complémentaire de *SMN* et séquence prédite d'acides aminés de la protéine *SMN*
- p 31 Figure 12 : différents domaines de la protéine *SMN*
- p 32 Figure 13 : niveaux de protéine *SMN* dans différents tissus
- p 33 Figure 14 : analyse immunocytochimique du nombre de gems dans des fibroblastes
- p 34 Figure 15 : expression de *SMN* en fonction du temps
- p 35 Figure 16 : complexe *SMN* et ses substrats
- p 36 Figure 17 : fonction de *SMN* dans l'assemblage snRNP
- p 38 Figure 18 : localisation de la protéine *SMN* dans un neurone corticale de poulet
- p 38 Figure 19 : croissance des neurites dans une culture primaire de motoneurones
- p 48 Figure 20 : séquence d'acides aminés des protéines *SMN* humaine et murine
- p 48 Figure 21 : morphologie et coloration TUNEL d'embryons contrôles et invalidés pour *Smn*
- p 49 Figure 22 : représentation schématique du transgène *SMN2*
- p 49 Figure 23 : souris mimant la SMA et souris contrôle de la même portée
- p 50 Figure 24 : invalidation ciblée du gène *Smn* murin
- p 50 Figure 25 : organisation génique du transgène *SMN2* humain
- p 51 Figure 26 : phénotypes des souris mimant la SMA
- p 51 Figure 27 : mutagenèse conditionnelle de l'exon 7 de *Smn* murin
- p 52 Figure 28 : défauts moteurs chez les souris *SMN^{F7/Δ7}, Cre⁺*
- p 53 Figure 29 : défauts moteurs chez les souris *SMN^{F7/Δ7}, HSA-Cre⁺*
- p 56 Figure 30 : représentation schématique des composants de l'unité motrice
- p 57 Figure 31 : différents types d'unités motrices
- p 61 Figure 32 : différents stades de maturation des jonctions neuromusculaires
- p 66 Figure 33 : représentation schématique du récepteur au NMDA
- p 66 Figure 34 : sous-unité du récepteur au NMDA
- p 67 Figure 35 : schéma du complexe protéique associé au NMDAR
- p 67 Figure 36 : niveaux d'expression des sous-unités du NMDAR dans la moelle épinière lombaire au cours du développement
- p 71 Figure 37 : caractéristiques structurales des récepteurs de l'insuline, l'IGF-1 et hybride
- p 72 Figure 38 : les mutants hétérozygotes pour *IGF-1R* vivent plus longtemps et sont plus résistants au stress oxydant
- p 73 Figure 39 : profils d'expression, dans les muscles de patients atteints de SMA, des différentes voies moléculaires impliquées dans l'hypertrophie ou l'atrophie
- p 157 Figure 40 : modulation de l'expression du gène *SMN2* dans les différents modèles de souris mimant la SMA et en fonction des traitements présentés dans les articles 1, 2 et 3

LISTE DES TABLEAUX

p 20	Tableau 1 : incidence pour tous les types de SMA confondus
p 21	Tableau 2 : incidence pour les SMA de type I
p 21	Tableau 3 : incidence pour les SMA de types II et III
p 21	Tableau 4 : prévalence pour tous les types de SMA confondus
p 21	Tableau 5 : prévalence pour les SMA de type I
p 21	Tableau 6 : prévalence pour les SMA de types II et III
p 21	Tableau 7 : prévalence du gène <i>SMN</i> à l'état hétérozygote
p 23	Tableau 8 : fréquence des délétions homozygotes du gène <i>SMN1</i>
p 23	Tableau 9 : liste des mutations de <i>SMN1</i> entraînant un SMA
p 29	Tableau 10 : fréquence du nombre de copies de <i>SMN1</i> parmi différentes ethnies
p 33	Tableau 11 : analyse du nombre de gènes dans les fibroblastes en fonction du phénotype
p 40	Tableau 12 : liste des différents partenaires de <i>SMN</i> et leurs fonctions
p 41	Tableau 13 : récapitulatif des différentes prises en charge de la SMA
p 41	Tableau 14 : derniers essais cliniques sur des patients atteints de SMA

PRÉAMBULE

De nos jours, nous disposons de nombreuses données sur les effets de l'exercice physique dans le cadre de dysfonctionnements du système nerveux central. Ainsi les études montrent que l'exercice physique modéré peut être neuroprotecteur : il atténue les déficits moteurs (Klintsova et coll., *Brain Res*, 1998), limite les détériorations lors de processus neurodégénératifs (Arkin, *Gerontologist*, 1999; Larsen et coll., *J Comp Neurol*, 2000) et améliore également les capacités cognitives chez les personnes âgées (Kramer et coll., *Brain Res Bull*, 2000; Kramer et Erickson, *Trends Cogn Sci*, 2007).

Il a récemment été démontré au laboratoire qu'un exercice de course quotidien, dans une roue à vitesse contrôlée, était bénéfique pour des souris mimant l'Amyotrophie Spinale Infantile (SMA) de type II (Grondard et coll., *J Neurosci*, 2005; Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008). Il a été constaté une nette augmentation de la durée de vie, de la prise de poids et de l'activité spontanée des souris malades entraînées par rapport aux souris malades sédentaires. De plus, l'exercice physique quotidien induit une neuroprotection des motoneurones lombaires, une accélération de la maturation des unités motrices et une augmentation de l'expression de la protéine Survival of Motor Neuron (SMN). Bien qu'aucun traitement efficace n'ait été trouvé à ce jour contre la SMA, nos résultats suggèrent qu'une activité physique adaptée constituerait une alternative permettant de limiter certains symptômes et éventuellement améliorer la durée de vie des patients. Cependant, l'exercice physique ne peut être proposé à tous les individus atteints de SMA, en particulier ceux atteints de forme sévère. C'est pourquoi l'identification des mécanismes moléculaires activés par l'exercice revêt un intérêt indéniable.

Le L-glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central chez les mammifères. Il induit de multiples changements durables de structure, d'excitabilité et de fonction des neurones via deux classes de récepteurs: ionotropiques, les récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NMDAR), AMPA ou Kaïnate et les récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G. Il s'avère que les NMDARs font partie des acteurs principaux de l'exercice. En effet, un blocage spécifique de ces récepteurs par le MK801 lors de l'exercice abolit l'essentiel des effets bénéfiques chez les souris mimant la SMA de type II (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008).

En outre, la voie Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) est considérée aujourd'hui comme un des principaux médiateurs des effets de l'exercice physique sur le système nerveux central. Ainsi il a été observé que l'augmentation du taux d'IGF-1 suite à l'exercice physique, était corrélée avec l'arrêt de la dégénérescence neuronale dans des lésions cérébrales (Carro et coll., *J Neurosci*, 2000; Carro et coll., *J Neurosci*, 2001). Par ailleurs, différentes études suggèrent qu'il existe une perturbation de la signalisation IGF-1 dans un contexte de SMA : une réduction du niveau d'IGF-1 circulant (Hua et coll., *Nature*, 2011; Murdocca et coll., *Mol Med*, 2012) et une surexpression des transcrits codant pour le récepteur à l'IGF-1 (Millino et coll., *BMC Med*, 2009).

C'est dans ce cadre scientifique que s'inscrit ce travail de thèse. Dans un premier temps, j'ai caractérisé les effets d'une activation *in vivo* des NMDARs sur l'ensemble de l'unité motrice et sur l'expression des gènes *SMN* dans un contexte de SMA. Dans un second temps, j'ai évalué les effets d'une modulation *in vivo* de la voie IGF-1. La compréhension de ces mécanismes nous permettrait de mieux appréhender la physiopathologie de cette maladie, pour l'heure incurable, et de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

INTRODUCTION

1. Les amyotrophies spinales

1.1. Historique

Le milieu du XIXe siècle marque un tournant dans l'étude des pathologies neurologiques. En effet grâce aux progrès de la neuro-anatomie, Claude Bernard distingue les paralysies d'origine musculaire de celles d'origine nerveuse dès 1858 (Bernard, *JB Baillière et fils*, 1858). En 1861, Guillaume-Benjamin Duchenne utilise le courant alternatif afin de stimuler des faisceaux musculaires choisis. Grâce à cette technique, il décrit plusieurs affections et localise leur origine comme la dystrophie musculaire qui porte désormais son nom (Duchenne, *JB Baillière et fils*, 1872). En 1868, Jean-Martin Charcot décrit la sclérose en plaques avec son collègue et ami Alfred Vulpian. Un an plus tard, il décrit la sclérose latérale amyotrophique et tente d'établir une relation entre l'atrophie musculaire progressive et la dégénérescence des cellules de la corne antérieure (Charcot et Marie, *Rev Med*, 1886). Jusque-là, la littérature médicale n'inclut pas les pathologies neurologiques infantiles.

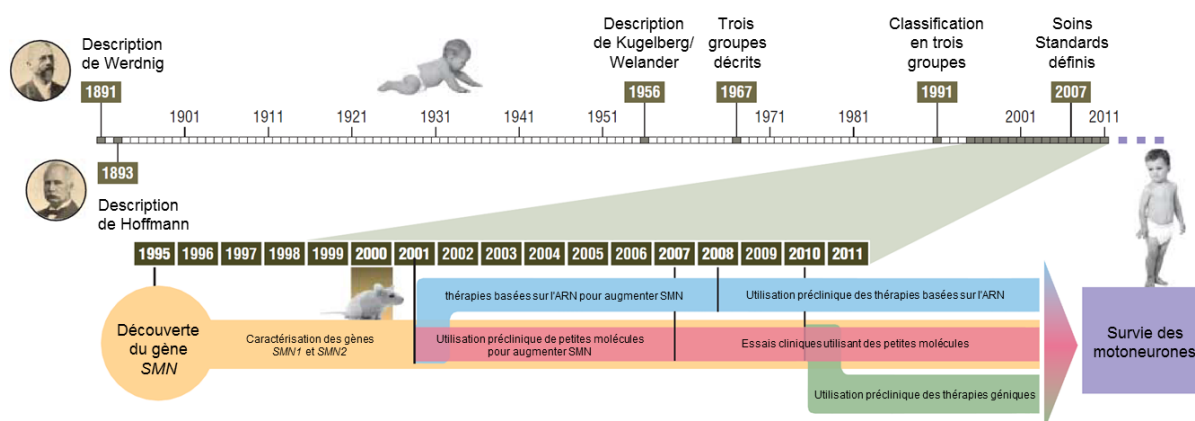


Figure 1 : l'amyotrophie spinale à travers le temps.
(Kolb et Kissel, *Arch Neurol*, 2011)

Les premiers cas d'amyotrophies spinales (ou SMA pour Spinal Muscular Atrophy) sont décrits vers la fin du XIXe siècle (Fig. 1). Ainsi en 1883, A.H. Bennet fait la description d'un phénotype correspondant à une forme sévère de SMA sous le titre « paralysie chronique atrophique spinale chez un enfant » (Bennet, *Brain*, 1883). En 1886, V.P. Gibney fait la première description anatomopathologique des cellules de la corne antérieure de la moelle épinière d'un patient atteint de SMA (Gibney, *J Ment Nerv Dis*, 1886). C'est le neurologue autrichien Guido Werdnig qui rapporte, pour la première fois, les observations de deux frères atteints « d'atrophie musculaire progressive ». En 1891, il établit que cette maladie familiale, à laquelle il donne son nom, débute avant la fin de la première année, que son évolution est sévère et qu'elle atteint les membres, le cou et le dos (Werdnig, *Arch psychiatr*, 1891). Ces observations sont confirmées deux ans plus tard par Johann Hoffman, professeur de neurologie à Heidelberg, qui décrit quatre autres cas « d'atrophie musculaire infantile progressive ». Ce dernier établit, suite au constat de lésions dégénératives des motoneurones à l'autopsie, l'origine médullaire de la maladie et y rattache également son nom (Hoffmann, *Dtsch Z Nervenheilkd*, 1893).

En 1900, le neurologue allemand Hermann Oppenheim décrit les premières formes congénitales de la maladie sous l'appellation de « myotonie congénitale » (Oppenheim, *Monatsschr Psychiatr Neurol*, 1900). Parallèlement, en 1902, le neurologue anglais Charles

Edward Beevor, constate des anomalies de la mobilité des fœtus chez des mères ayant donné naissance à des enfants atteints de SMA et évoque l'existence de formes anténatales (Beevor, *Brain*, 1902).

Il faut attendre 1950, pour la première étude approfondie portant sur la description de plusieurs cas de SMA sévère. Le danois Sven Brandt affirme le caractère autosomique récessif et la grande hétérogénéité clinique de la maladie en examinant 112 patients issus de 69 familles (Brandt, *Ejnar Munksgaard*, 1950). En 1954 et 1956, les Professeurs Erik Kugelberg et Lisa Welanders publient leurs observations sur douze patients présentant un syndrome « d'atrophie musculaire spinale pseudomyopathique ». L'âge de début de la maladie se situe entre 2 et 17 ans, une majorité a conservé la marche durant 20 ans ou plus et l'espérance de vie est normale (Kugelberg et Welanders, *Acta psychiatr Scand*, 1954, *Arch Neurol Psychiatr*, 1956). Byers et Banker réalisent une étude poussée sur une grande série de patients en 1961 et jettent les bases d'une première classification des amyotrophies spinales. Ils établissent une corrélation entre l'âge de début de la maladie, les capacités motrices et le pronostic vital (Byers et Banker, *Arch Neurol*, 1961). L'élaboration d'une stratégie thérapeutique adaptée à chaque groupe devient alors envisageable. Par la suite, de nombreuses études ont mis en avant la variabilité dans l'âge d'apparition des premiers symptômes et dans la progression de la maladie (Dubowitz, *Brain*, 1964; Munsat et coll., *Brain*, 1969).

En 1973, Pearn établit formellement la responsabilité d'un gène autosomique récessif dans tous les cas familiaux de SMA précoce (Pearn et coll., *Brain*, 1973). Puis, en 1978, il analyse la variabilité génomique entre et au sein des familles de 124 patients atteints de SMA plus ou moins sévères. Ne découvrant aucune différence significative, il conclut que l'altération d'un seul gène autosomique récessif est responsable dans 90% des cas de la maladie (Pearn et coll., *J Neurol Sci*, 1978). Cependant, il ne trouve aucune explication au fait que différents degrés de sévérité soient retrouvés au sein d'une même fratrie. Au début des années 90, grâce aux méthodes de génétique inverse, le gène responsable de la SMA est localisé sur le bras long du chromosome 5 (Gilliam et coll., *Nature*, 1990; Melki et coll., *Nature*, 1990; Davies et coll., *Neuromuscul Disord*, 1991). En 1995, les gènes *SMN1* et *SMN2*, pour Survival of Motor Neuron, codant la protéine du même nom, jusque-là inconnue, sont identifiés en France (Lefebvre et coll., *Cell*, 1995). Il s'avère que l'anomalie responsable de la SMA est une atteinte du gène *SMN1* dans plus de 95% des cas. Dans les 5 ans suivant la découverte du gène *SMN*, des modèles animaux mimant la SMA ont été développés.

1.2. Caractéristiques et classification

Les amyotrophies spinales sont des maladies neuromusculaires héréditaires de l'enfant ou de l'adolescent. Bien que présentant une grande hétérogénéité dans l'âge d'apparition des symptômes et la progression de la maladie, ces affections sont toutes caractérisées par la perte progressive des motoneurones des cornes ventrales de la moelle épinière. Dans certains cas, la dégénérescence peut aussi affecter les motoneurones bulbaires présents dans les noyaux des nerfs crâniens. Elles s'accompagnent, le plus souvent, d'une atteinte symétrique des muscles squelettiques par atrophie des fibres musculaires isolées ou regroupées en fascicules. En revanche, les muscles des organes, comme pour le contrôle de la vessie, ne sont pas touchés. De même, en aucun cas, les fonctions intellectuelles ou la sensibilité (toucher, chaleur, douleur...) ne sont altérées chez ces patients.

La quasi-totalité des SMA sont à prédominance proximale ; c'est-à-dire touchant les muscles du tronc et proches du tronc. Par ailleurs, le déficit moteur s'étend, dans un premier temps, aux muscles des membres inférieurs, puis dans un second temps, aux muscles des membres supérieurs. Il existe également des SMA à prédominance distale qui ressemblent

cliniquement à la maladie de Charcot-Marie-Tooth. Ces cas sont très peu fréquents (occurrence d'environ 1 naissance sur 100 000) et variables. Ceux-ci ne font pas l'objet de ce travail de recherche et ne seront pas davantage détaillés.

Malgré les progrès de la génétique humaine, la classification des différentes formes de SMA s'appuie encore essentiellement sur des critères physiologiques et cliniques. Ainsi, la classification du Consortium international SMA, établie en 1991, repose sur l'âge d'apparition des premiers symptômes, l'évolution du déficit moteur et l'âge du patient au moment du décès. Sur cette base, les SMA sont classées en 4 groupes dont la sévérité est décroissante : le type I ou maladie de Werdnig-Hoffmann, le type II ou type intermédiaire, le type III ou maladie de Kugelberg-Welander et type IV (Munsat, *Neuromuscul Disord*, 1991). Les types I, II et III sont également appelés les amyotrophies spinales infantiles.

Néanmoins, il faut garder à l'esprit que les différentes classifications ne constituent qu'un ensemble de repères d'une réalité fort complexe, un continuum de sévérité clinique entre les différents types. De plus, les classifications ne prennent pas en compte l'importance de la prise en charge sur le pronostic vital. Enfin, il n'est pas rare de rencontrer au sein d'une même famille des enfants atteints de différents types ou présentant une évolution très différente dans un même type. Il a été rapporté, par exemple, le cas de deux frères présentant le même type de SMA, l'un ayant perdu l'usage de ses jambes dès l'âge de 8 ans et l'autre marchant encore à 40 ans (Souchon et coll., *Neuromuscul Disord*, 1996).

1.2.1. La SMA de type I

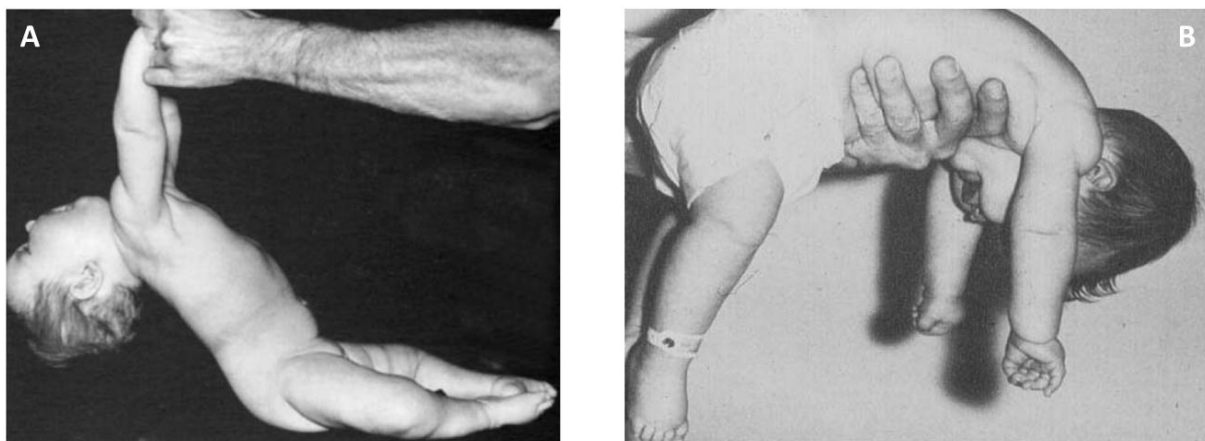


Figure 2 : postures caractéristiques des enfants atteints de SMA de type I. A, tête non maintenue en position assise avec les bras tirés vers le haut. B, posture en U inversé lors d'une suspension ventrale.

(Chang et Gieron-Korthals, *Fetal Pediatr Pathol*, 2011)

La SMA de type I, appelée maladie de Werdnig-Hoffmann est la forme la plus aiguë. Les premiers signes cliniques apparaissent dans les 6 premiers mois de la vie et le diagnostic est établi avant 3 mois. Les enfants sont atteints d'une hypotonie et d'un déficit moteur sévère, touchant les quatre membres et le tronc. Ce phénomène est, dans la majorité des cas, symétrique et prédomine aux ceintures des membres, c'est-à-dire au niveau des hanches et des épaules. Les réflexes ostéo-tendineux sont abolis ou très diminués. Certaines mères notent même une diminution des mouvements dans les derniers mois de leur grossesse. Ces enfants ne sont pas capables de soutenir leur tête, ni d'effectuer les mouvements normaux des membres attendus à cet âge, tels des secousses vigoureuses des jambes (Fig. 2). Par conséquent, ils ne peuvent maintenir une station assise sans une aide extérieure. Les muscles de ces enfants tendent à se rétracter et fixent les articulations. Ceci entraîne une attitude demie fléchie des genoux, des coudes et une rotation des pieds vers l'intérieur. Des tremblements au niveau des doigts sont parfois observés (Spiro, *Neurology*, 1970; Fredericks et Russman, *Neurology*, 1979). Dans les cas les plus sévères,

les bébés sont quasiment immobiles dès la naissance à l'exception de petits mouvements des mains, des pieds et des yeux.

L'analyse des biopsies musculaires des enfants atteints de SMA de type I a révélé des fibres musculaires anormalement petites là où des fibres larges étaient attendues (Fig. 3A) et des regroupements inhabituels de fibres larges (Fig. 3B).

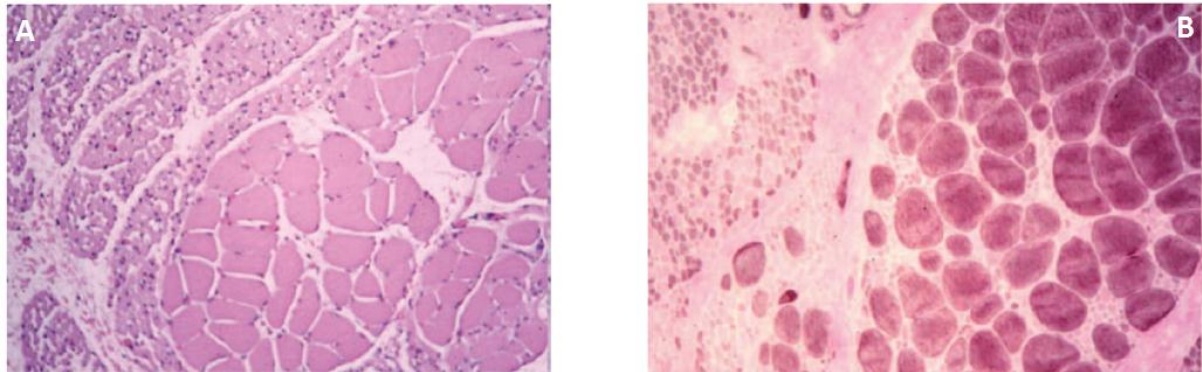


Figure 3 : biopsies musculaires d'enfants atteints de SMA de type I. A, Coloration hémalun-éosine montrant des fibres musculaires anormalement petites chez les enfants atteints de SMA de type I. B, Marquage de l'ATPase à pH 4,3 montrant le regroupement anormal des fibres musculaires larges chez les enfants atteints de SMA de type I.

(Chang et Gieron-Korthals, *Fetal Pediatr Pathol*, 2011)

De plus, il est fréquent que ces enfants présentent des problèmes de déglutition, rendant la gestion de leurs propres sécrétions compliquée. Leur succion lors de la tétée est faible et l'effort de mastication entraîne chez ces bébés une fatigue importante, rendant la prise d'alimentation difficile, voire impossible. Dans certains cas, la langue peut être atrophiée et peut présenter des mouvements non contrôlés ou de légers tremblements, appelés fasciculations (Byers et Banker, *Arch Neurol*, 1961; Iannaccone et coll., *Pediatr Neurol*, 1993). Ce dernier phénomène serait lié à la dégénérescence des noyaux du nerf crânien XII, l'hypoglosse (Tizzano et coll., *Am J Pathol*, 1998).

La SMA de type I aboutit très rapidement à une insuffisance respiratoire gravissime. Les muscles intercostaux sont affectés et ne permettent plus de gonfler la poitrine correctement. De ce fait, la respiration repose quasi-entièrement sur la contraction du diaphragme, la poitrine se développe peu et devient légèrement concave. Les poumons, étant sollicités par une respiration ventrale déséquilibrée, se développent peu et ont tendance à se replier. De ce fait, ces enfants présentent souvent des atélectasies. Il est difficile pour ces derniers de prendre des respirations suffisamment profondes durant le sommeil. De plus, ces dernières années il a été démontré que certains cas de SMA de type I pouvaient avoir des défauts cardiaques (Rudnik-Schoneborn et coll., *J Med Genet*, 2008; Shababi et coll., *Hum Mol Genet*, 2010). Il semblerait que des défauts des septums entre les ventricules et/ou les oreillettes, associés à des troubles du système nerveux autonome, soient responsables d'arythmie et de mort subite. L'issue de la SMA de type I est généralement fatale en moins de deux ans. La probabilité de survie à l'âge de 1 an est de 92%, 1 an et demi 76%, 2 ans 32%, 4 ans 18%, 10 ans 8% et 20 ans 0% (Zerres et coll., *Lancet*, 1995; Park et coll., *Korean J Pediatr*, 2010).

A noter, que seules les formes prénatales, assimilables à un type 0, présentent une hypomyélinisation et une structure histologique anormale des nerfs périphériques (Korinthenberg et coll., *Ann Neurol*, 1997; MacLeod et coll., *Eur J Paediatr Neurol*, 1999; Hergersberg et coll., *Eur J Paediatr Neurol*, 2000).

1.2.2. La SMA de Type II

Cette forme dite intermédiaire est la plus fréquente. Les premiers signes cliniques apparaissent avant l'âge de 18 mois et le diagnostic est posé avant l'âge de 15 mois dans la plupart des cas. Les enfants sont atteints d'une paraplégie ou d'une tétraplégie plus ou moins complète. Ils sont capables de maintenir la position assise mais, en revanche, incapables de se mettre debout et de marcher sans aide extérieure. Les problèmes de déglutitions ne sont pas caractéristiques de ce type mais peuvent être présents dans certains cas. De ce fait, certains patients ont du mal à ingurgiter suffisamment de nourriture pour maintenir leur poids et leur croissance.

Tout comme dans le type I, les patients présentent des complications thoraco-pulmonaires. La paralysie des muscles intercostaux et la respiration par le diaphragme déteignent sur la souplesse et la morphologie thoraciques, entraînant un syndrome restrictif plus ou moins important. De ce fait, ces patients sont particulièrement sensibles aux maladies respiratoires comme la bronchite et la pneumonie.

Les enfants atteints de SMA de type II ont fréquemment des fasciculations au niveau de la langue et de légers tremblements se manifestent au niveau de leurs doigts. Les raideurs et déformations articulaires touchant le rachis (scoliose, cyphose, dos creux) et les membres (flexum, varus équin aux membres inférieurs, déformations des poignets et des mains) sont très fréquentes. En effet, l'absence de mouvement et la non-sollicitation des leviers articulaires provoquent une sclérose progressive et une rétraction des parties molles péri-articulaires, tels les tendons, muscles et ligaments. La rupture d'équilibre entre les muscles agonistes et antagonistes d'une même articulation entraîne une déformation dans le sens du muscle, ou groupe de muscles, le plus fort. On observe en conséquence, une baisse du tonus musculaire (Moosa et Dubowitz, *Arch Dis Child*, 1973; Fredericks et Russman, *Neurology*, 1979) et une absence de réflexe des tendons chez 70% des individus atteints par la SMA de type II (Iannaccone et coll., *Pediatr Neurol*, 1993). En outre, la croissance osseuse tend à aggraver ce phénomène. On observe très souvent une perte de densité osseuse, rendant ces enfants plus sensibles aux fractures lors de traumatismes bénins (Fujak et coll., *Arch Orthop Trauma Surg*, 2010). La durée de vie de ces patients est globalement inférieure à 40 ans. La probabilité de survie à 4 ans est de 100%, 10 ans 98% et 20 ans 77% (Zerres et coll., *Lancet*, 1995).

1.2.3. La SMA de type III

Le type III ou maladie de Kugelberg-Welander apparaît après l'acquisition de la marche. Les patients dont les premiers signes visibles de la maladie apparaissent avant 3 ans sont classés comme type IIIa et ceux dont les signes cliniques apparaissent après 3 ans sont classés comme type IIIb. Il se manifeste chez ces patients une atrophie et une faiblesse musculaire, la plupart du temps symétrique, et lentement progressive prédominant aux membres inférieurs. Cet affaiblissement musculaire au niveau des hanches s'étendra, par la suite, aux jambes puis dans les épaules.

Ces patients peuvent se tenir debout seul et marcher mais vont avoir des difficultés déambulatoires croissantes. Ils présentent donc des risques de chute plus importants et ne pourront jamais courir. Le processus de perte de la marche est souvent corrélé à des poussées de croissance ou des maladies et s'échelonne sur des années. Il n'est pas rare que les patients développent des scolioses, de l'obésité ou de l'ostéoporose suite à cette perte (Kinali et coll., *Neuropediatrics*, 2004; Khatri et coll., *J Clin Neuromuscul Dis*, 2008). Il a été démontré que 44% des individus de type IIIa gardaient la capacité de marcher après 20 ans et 89% des individus de type IIIb (Zerres et coll., *Lancet*, 1995).

Des tremblements au niveau des doigts sont également observés et, dans certains cas, des fasciculations au niveau de la langue. Le pronostic vital est engagé à l'âge adulte mais certains patients peuvent avoir une durée de vie normale.

1.2.4. La SMA de type IV

Ce dernier type est la forme adulte de la maladie, pour laquelle les symptômes se déclarent entre 18 et 35 ans. Les signes cliniques sont peu marqués et la progression de la maladie est très lente. Les muscles des cuisses et des bras s'affaiblissent peu à peu. Les symptômes sont proches de la SMA de type III (marche et course dandinant, maladresse) mais sont atténués. Les fonctions respiratoires ne sont pas touchées et les patients présentent une durée de vie normale.

1.3. Epidémiologie

Les études épidémiologiques sur les SMA sont rares. En France, il n'existe aucun registre officiel avec le nombre précis de patients atteints de SMA. Pourtant la SMA est la maladie neuromusculaire la plus fréquente chez l'enfant, après la dystrophie musculaire de Duchenne. Elle est, parmi les maladies génétiques à transmission autosomique récessive, la plus fréquente, après la mucoviscidose, dans les populations caucasiennes. L'Association Française contre les Myopathies estime qu'il y a en France environ 120 nouveaux cas par an et environ 2 500 personnes vivant avec la SMA tous types confondus.

1.3.1. Incidence

Le terme d'incidence désigne le nombre d'enfants nés au cours d'une année et qui vont développer la maladie. Ce nombre est exprimé par rapport au nombre de nouveau-nés vivants au cours de la même période. Si l'on se base sur les différentes études disponibles, l'incidence de la SMA, tous types confondus, est d'environ 1/6 000 naissances. Bien que cette maladie soit pan-ethnique, ce taux fluctue en fonction des origines géographiques. Par exemple, les populations d'origines noires africaines présentent plus d'individus ayant 3 ou 4 copies du gène *SMN1* et/ou 0 ou 1 copie du gène *SMN2* ; ce qui diminue leur probabilité d'avoir des enfants atteints de SMA (Labrum et coll., *Neuromuscul Disord*, 2007; Hendrickson et coll., *J Med Genet*, 2009).

Par ailleurs, la consanguinité comme dans toutes les maladies récessives est un facteur favorisant important dans l'émergence de la SMA. Ainsi, l'incidence est particulièrement élevée dans certaines communautés en Israël (Fried et Mundel, *Clin Genet*, 1977) ou dans l'île de la Réunion (Pascalet-Guidon et coll., *Clin Genet*, 1984).

1/16 667	Canada	(Winsor et coll., <i>J Med Genet</i> , 1971)
1/17 857	Suisse	(Zellweger et Hanhart, <i>Helv Paediatr Acta</i> , 1972)
1/400	Communauté Karaïte, Israël	(Fried et Mundel, <i>Clin Genet</i> , 1977)
1/1 263	Communauté européenne de l'île de la Réunion	(Pascalet-Guidon et coll., <i>Clin Genet</i> , 1984)
1/12 820	Italie	(Mostacciolo et coll., <i>Neuroepidemiology</i> , 1992)
1/10 000	Allemagne	(Mailman et coll., <i>Hum Genet</i> , 2001)
1/1 945	Populations blanches d'Afrique du sud	(Labrum et coll., <i>Neuromuscul Disord</i> , 2007)
1/3 574	Populations noires d'Afrique du sud	(Labrum et coll., <i>Neuromuscul Disord</i> , 2007)
1/9 320	Pologne	(Jedrzejowska et coll., <i>Neuroepidemiology</i> , 2010)

Tableau 1 : incidence pour tous les types de SMA confondus.

1/25 708	Royaume Uni	(Pearn, <i>J Med Genet</i> , 1973)
1/18 182	Finlande	(Ignatius et Donner, <i>Lang H, ed Lihastautien Kehittyvä Tutkimus Ja hoito Turku Kiasma</i> , 1989)
1/15 131	Hongrie	(Czeizel et Hamula, <i>J Med Genet</i> , 1989)
1/518	Arabie Saoudite	(Al-Rajeh et coll., <i>Ann Saudi Med</i> , 1992)
1/22 728	Italie	(Mostacciolo et coll., <i>Neuroepidemiology</i> , 1992)

Tableau 2 : incidence pour les SMA de type I.

1/8 928	Royaume Uni	(Pearn, <i>J Med Genet</i> , 1978)
1/62 500	Finlande	(Ignatius et Donner, <i>Lang H, ed Lihastautien Kehittyvä Tutkimus Ja hoito Turku Kiasma</i> , 1989)

Tableau 3 : incidence pour les SMA de types II et III.

1.3.2. Prévalence

Le terme de prévalence désigne le nombre d'individus atteints dans une population donnée à un moment donné exprimé par rapport au nombre total d'individus exposés au risque de la maladie. Dans le cas d'une maladie autosomique, la population tout entière est exposée au risque.

1/135 135	Canada	(Winsor et coll., <i>J Med Genet</i> , 1971)
1/22 727	Norvège	(Tangsrud et Halvorsen, <i>Clin Genet</i> , 1988)
1/30 000	Population roms de Bulgarie	(Jordanova et coll., <i>Neuromuscul Disord</i> , 2002)
1/75 000	Population roms de Hongrie	(Jordanova et coll., <i>Neuromuscul Disord</i> , 2002)

Tableau 4 : prévalence pour tous les types de SMA confondus.

1/588 235	Norvège	(Winsor et coll., <i>J Med Genet</i> , 1971; Tangsrud et
1/108 695	Arabie Saoudite	(Al-Rajeh et coll., <i>Ann Saudi Med</i> , 1992)

Tableau 5 : prévalence pour les SMA de type I.

1/25 000	Norvège	(Tangsrud et Halvorsen, <i>Clin Genet</i> , 1988)
1/83 333	Royaume Uni	(Pearn, <i>J Med Genet</i> , 1978)

Tableau 6 : prévalence pour les SMA de types II et III.

1.3.3. Porteurs hétérozygotes de la mutation du gène SMN

1/80	Angleterre	(Pearn, <i>J Med Genet</i> , 1973)
1/50	Estimation mondiale	(Emery, <i>Neuromuscul Disord</i> , 1991)
1/57	Italie	(Mostacciolo et coll., <i>Neuroepidemiology</i> , 1992)
1/35 - 1/50	Allemagne	(Mailman et coll., <i>Hum Genet</i> , 2001; Feldkotter et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 2002)
1/34	France	(Cusin et coll., <i>J Med Genet</i> , 2003)
1/50	Populations noires sud-africaines	(Labrum et coll., <i>Neuromuscul Disord</i> , 2007)
1/23	Populations blanches sud-africaines	(Labrum et coll., <i>Neuromuscul Disord</i> , 2007)
1/37	Population caucasienne nord-américaine	(Hendrickson et coll., <i>J Med Genet</i> , 2009)
1/56	Population d'origine asiatique nord-américaine	(Hendrickson et coll., <i>J Med Genet</i> , 2009)
1/91	Population d'origine africaine nord-américaine	(Hendrickson et coll., <i>J Med Genet</i> , 2009)
1/50	Corée du sud	(Yoon et coll., <i>Korean J Lab Med</i> , 2010)
1/35	Pologne	(Jedrzejowska et coll., <i>Neuroepidemiology</i> , 2010)
1/48	Taiwan	(Su et coll., <i>PLoS One</i> , 2011)

Tableau 7 : prévalence du gène SMN à l'état hétérozygote.

1.3.4. Répartition par sexe

La sévérité clinique ne semble pas corrélée au sexe (Pearn et coll., *J Neurol Sci*, 1978). Tous types confondus, le sexe masculin prédomine dans un rapport de 3 hommes pour 2 femmes (Rudnik-Schoneborn et coll., *Am J Med Genet*, 1994). Il semble cependant que les SMA de type III prédominent chez l'homme dans un rapport de 7 pour 3 alors que les formes de type I et II prédominent chez la femme (Hausmanowa-Petrusewicz et coll., *J Neurol Sci*, 1979).

1.4. Aspects génétiques

Le gène dont l'altération déclenche la SMA a été localisé dans les années 90 sur le bras long du chromosome 5 dans la région 5q11.2-q13.3 (Brzustowicz et coll., *Nature*, 1990; Gilliam et coll., *Nature*, 1990; Melki et coll., *Nature*, 1990; Sheth et coll., *Am J Hum Genet*, 1991; Morrison et coll., *Am J Hum Genet*, 1992; Clermont et coll., *Am J Hum Genet*, 1994) grâce à une liaison génétique établie entre le locus de la maladie et des marqueurs génétiques polymorphes à partir d'un panel de familles informatives. Ces travaux ont permis de réaliser les premiers diagnostics prénatals de SMA (Daniels et coll., *J Med Genet*, 1992; Muller et coll., *Am J Hum Genet*, 1992).

1.4.1. Gènes *SMN1* et *SMN2*

Les gènes responsables de la SMA sont les gènes de la famille SMN ou Survival of Motor Neuron. Ils sont localisés dans une région instable et très complexe du chromosome 5. En effet, cette région contient des pseudo-gènes, des séquences multiples de copies répétitives et des séquences analogues à des transposons (Francis et coll., *Hum Mol Genet*, 1993; Kleyn et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993; Melki et coll., *Science*, 1994). Par ailleurs, il a été démontré que cette région présente une duplication en miroir d'environ 500kb chez 95% de la population. On y retrouve les copies d'au moins 4 gènes : le gène *H4F5* dont la fonction est encore inconnue (Burglen et coll., *Am J Hum Genet*, 1997; Scharf et coll., *Nat Genet*, 1998), le gène *SMN*, le gène codant pour la protéine NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein) (Roy et coll., *Cell*, 1995) et le gène codant pour la protéine p44 (Biros et Forrest, *J Med Genet*, 1999). Pour chacun de ces gènes il y a donc une copie en direction centromérique et une copie en direction télomérique (Fig. 4). Il semblerait que cette duplication soit un événement récent dans l'évolution puisque les régions codantes de ces gènes sont hautement conservées (Scharf et coll., *Nat Genet*, 1998; Rochette et coll., *Hum Genet*, 2001).

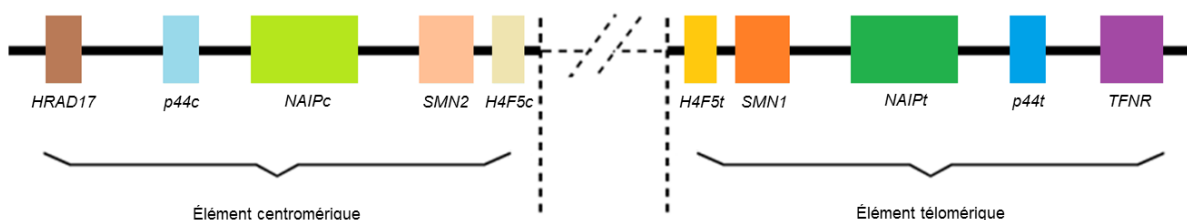


Figure 4 : organisation génomique du locus SMA, région 5q11-q13.

(Wirth, *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2002)

Le gène *SMN* est un gène de 27kb composé de 9 exons. Trois exons sont alternatifs, les exons 3, 5 et 7. L'exon 8 contient le codon stop. Plusieurs motifs sont codés par ces exons, notamment une région basique riche en lysine codée par l'exon 2, un motif Tudor codé par l'exon 3, une région polyproline codée par les exons 4 et 5 et une région avec différentes paires tyrosine-glycine (Y-G) codée par l'exon 6.

Les transcrits *SMN* font 1,7kb et codent pour une protéine d'une masse de 32kDa et 294 acides aminés (Lefebvre et coll., *Cell*, 1995; Burglen et coll., *Genomics*, 1996; Chen et coll., *Genomics*, 1998). Le gène ancestral *SMN* appelé *SMN1* (ou *SMNt*) se situe dans la partie télomérique de la région 5q13 et sa copie inversée *SMN2* (ou *SMNc*) dans la partie centromérique.

Pays	Nombre de patients	Délétion du gène <i>SMN1</i>	Références
Royaume Uni	140	97,8%	(Rodrigues et coll., <i>Lancet</i> , 1995)
Allemagne	191	90%	(Wirth et coll., <i>Prenat Diagn</i> , 1995)
Pays Bas	103	93%	(Cobben et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1995)
Taiwan	42	100%	(Chang et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1995)
Espagne	54	91%	(Bussaglia et coll., <i>Nat Genet</i> , 1995)
France	229	98,6%	(Lefebvre et coll., <i>Cell</i> , 1995)

Tableau 8 : fréquence des délétions homozygotes du gène *SMN1*.

Il a été démontré que le gène *SMN1* est absent ou tronqué chez la grande majorité des patients atteints de SMA, toutes formes confondues (Lefebvre et coll., *Cell*, 1995). A l'inverse, il est toujours présent dans une population contrôle. On retrouve dans 95% des cas une délétion homozygote emportant au moins l'exon 7 du gène *SMN* (Tab. 8). Dans les 5% restant, il s'agit de mutations intragéniques non-sens ou faux sens, de décalage du cadre de lecture ou diverses délétions. A ce jour 28 mutations différentes du gène *SMN* ont été identifiées (Tab. 9). Par ailleurs, il a été constaté que les délétions emportant tout ou une grande partie du gène sont plus fréquentes dans les formes sévères. Le nombre de porteurs de mutations du gène *SMN1* est moins élevé dans certaines populations, diminuant ainsi l'occurrence de la SMA au sein de ces populations (Sugarman et coll., *Eur J Hum Genet*, 2012).

Type de mutation	Mutation de <i>SMN1</i>	Type de SMA	Références
Délétions	Exon 8 Intron 4 à Intron 6	II et III I	(Gambardella et coll., <i>Ann Neurol</i> , 1998) (Wirth et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1999)
Mutations non-sens	Exon 1 : Q15X Exon 3 : W102X	I, II et III III	(Wirth et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1999) (Sossi et coll., <i>Eur J Hum Genet</i> , 2001)
Décalage du cadre de lecture	Exon 1 : 27insG Exon 2a : 124insT Exon 2b : 241-242ins4 Exon 3 : 425del5 Exon 3 : 430 del4 Exon 3 : 472del5 Exon 4 : 542delGT Exon 4 : 591delA Exon 4 : 618insT Exon 6 : 773insC Exon 6 : 813ins/dup11 Intron 6 : c.867+2T→G	II I III III I, II et III I I, II et III II I III I et II I	(Skordis et coll., <i>Hum Genet</i> , 2001) (Wirth et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1999) (Wirth et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1999) (Sossi et coll., <i>Eur J Hum Genet</i> , 2001) (Bussaglia et coll., <i>Nat Genet</i> , 1995) (Brahe et Bertini, <i>J Mol Med</i> , 1996) (Parsons et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1998) (Wirth et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1999) (Clermont et coll., <i>Lancet</i> , 1995) (Martin et coll., <i>Hum Genet</i> , 2002) (Parsons et coll., <i>Hum Mol Genet</i> , 1996) (Martin et coll., <i>Hum Genet</i> , 2002)
Mutation d'un site d'épissage	Intron 6 : c.868-11del7 Intron 7 : c.922+3del4 Intron 7 : c.922+6T→G	I II III	(Lefebvre et coll., <i>Cell</i> , 1995) (Lefebvre et coll., <i>Cell</i> , 1995) (Wirth et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1999)
Mutation faux-sens	Exon 1 : A2G Exon 3 : E134K Exon 6 : P245L Exon 6 : S261I Exon 6 : Y272C Exon 6 : T274I Exon 6 : G275S Exon 7 : G279C Exon 7 : G279V	II et III I III III I, II et III II et III III II et III I	(Parsons et coll., <i>Am J Hum Genet</i> , 1998) (Clermont et coll., <i>Lancet</i> , 1995) (Rochette et coll., <i>Neurogenetics</i> , 1997) (Hahnen et coll., <i>Hum Mol Genet</i> , 1997) (Lefebvre et coll., <i>Cell</i> , 1995) (Hahnen et coll., <i>Hum Mol Genet</i> , 1997) (Burglen et coll., <i>Genomics</i> , 1996) (Wang et coll., <i>Neurogenetics</i> , 1998) (Talbot et coll., <i>Hum Mol Genet</i> , 1997)

Tableau 9 : liste des mutations de *SMN1* entraînant un SMA.

(Wirth, *Hum Mutat*, 2000)

Dans 2% des cas de SMA, la maladie est due à la survenue d'une mutation *de novo* du gène *SMN1* chez l'enfant atteint. Ceci implique que la maladie n'a pas été transmise par les parents et que ceux-ci ont un risque semblable à celui de la population générale de donner naissance à un autre enfant atteint.

Bien que *SMN1* et *SMN2* aient une homologie de séquence très élevée, *SMN1* produit une majorité de transcrits complets alors que *SMN2* produit une majorité de transcrits ne contenant pas d'exon 7, réduisant ainsi la capacité d'oligomérisation de la protéine SMN résultante (Lorson et coll., *Nat Genet*, 1998; Lorson et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999). Le transcrit tronqué, ne possédant pas l'exon 7, code une protéine dépourvue des 16 acides aminés de la partie C-terminale ; il est appelé SMN Δ 7.

Trois des cinq modifications nucléotidiques majeures entre *SMN1* et *SMN2* se trouvent dans des introns, une se trouve dans l'exon codant 7 et une autre dans l'exon non-codant 8 (Monani et coll., *Hum Mol Genet*, 1999). La substitution de la Cytosine en Thymine en position +6 de l'exon 7 (position 840 sur le gène) a un rôle crucial dans la maladie (Fig. 5). En effet, bien que ce polymorphisme ne modifie pas le sens du codon, celui-ci induit un épissage alternatif où l'exon 7 est excisé (Lefebvre et coll., *Cell*, 1995). De ce fait, *SMN2* produit environ 90% de protéine SMN Δ 7, c'est-à-dire la protéine tronquée, sans l'exon 7 (Fig. 6) (Lorson et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999). Ainsi les mutations du gène *SMN1* déclenchent une SMA et les altérations du gène *SMN2* n'induisent aucune maladie. De plus, le gène *SMN2*, n'étant pas pleinement fonctionnel, ne peut compenser le défaut d'expression lié à la mutation du gène *SMN1* chez les patients atteints de SMA (Cifuentes-Diaz et coll., *J Cell Biol*, 2001). Par ailleurs, il a été constaté récemment que les niveaux de protéine SMN exerçaient un rétro-contrôle sur l'épissage de l'exon 7 dans les transcrits SMN. Ainsi, une faible expression de la protéine SMN induit une diminution de l'inclusion de l'exon 7 (Jodelka et coll., *Hum Mol Genet*, 2010).

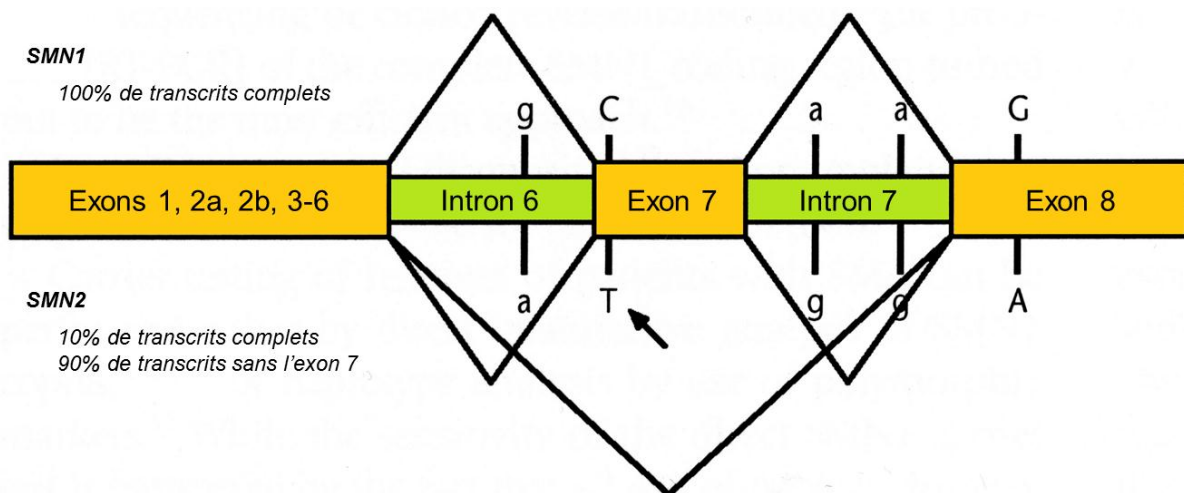


Figure 5 : structure génomique et différences d'épissage entre les gènes *SMN1* et *SMN2*. (Wirth et coll., *Prog Mol Subcell Biol*, 2006)

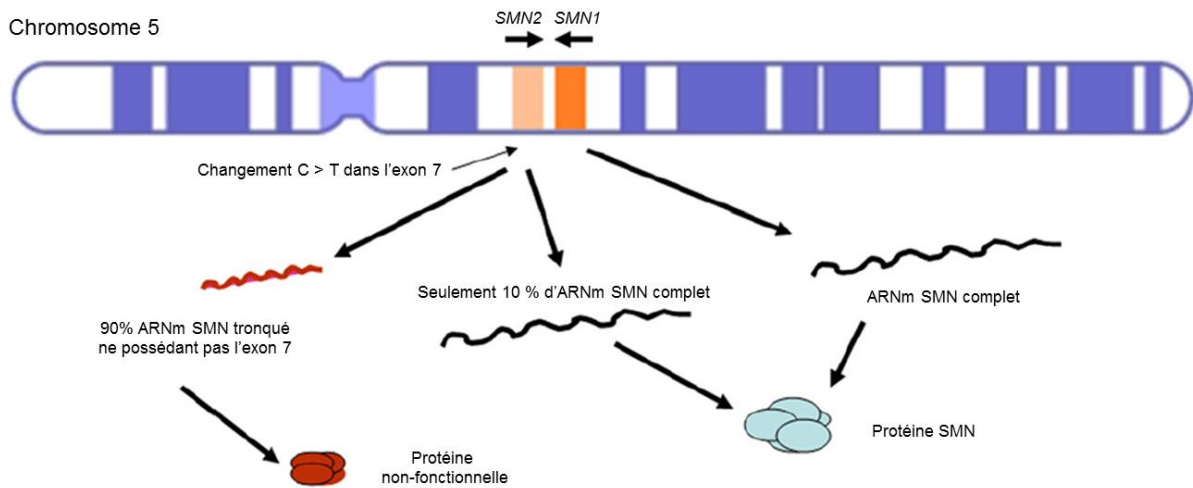


Figure 6 : diagramme schématique de l'expression des gènes *SMN1* et *SMN2*
(Markowitz et coll., *Pediatr Neurol*, 2012)

Deux phénomènes expliquent la modification du profil d'épissage du gène *SMN2* par rapport au gène *SMN1* (Fig. 7). D'une part, la substitution de la Cytosine en Thymine dans l'exon 7 induit la création d'un élément d'épissage de type silencieux (Exonic Splicing Silencer ou ESS). Des facteurs de répression d'épissage, tel hnRNP A1, se fixent sur ce site et induisent l'exclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN (Kashima et Manley, *Nat Genet*, 2003; Kashima et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007; Doktor et coll., *Hum Mutat*, 2011). Ainsi, il a été démontré récemment que cette substitution nucléotidique créait un site de liaison de type TTTTA pour la protéine Sam68. Celle-ci interagissait avec hnRNP A1 via sa partie C-terminale et déclenchait l'excision de l'exon 7 (Pedrotti et coll., *EMBO J*, 2010).

D'autre part cette même substitution modifie un élément activateur de l'épissage (Exonic Splicing Enhancer ou ESE). Les facteurs d'épissage ASF/SF2 ne peuvent plus détecter le site d'épissage en 3' (Lorson et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; Lorson et Androphy, *Hum Mol Genet*, 2000; Cartegni et Krainer, *Nat Genet*, 2002) (Lorson et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; Lorson et Androphy, *Hum Mol Genet*, 2000; Cartegni et Krainer, *Nat Genet*, 2002; Cartegni et coll., *Am J Hum Genet*, 2006).

Il a récemment été démontré que l'inhibition des différents motifs ESS par des oligomorpholinos était bénéfique chez les souris mimant la SMA (Porensky et coll., *Hum Mol Genet*, 2012). Ainsi, une injection intracérébrale de morpholinos dirigés contre ISS-N1 (site entre -10 à -29 dans l'exon 7 du gène *SMN2*) à la naissance, augmente de plus de 7 fois la durée de vie des souris mimant la SMA (15 jours pour les souris traitées avec un placebo et plus de 100 jours pour celles traitées avec les morpholinos). Ce traitement est capable d'augmenter très fortement le niveau de transcrits SMN possédant l'exon 7 dans le système nerveux central et faiblement dans les tissus périphériques. Cependant, la modification de l'épissage diminue avec le temps.

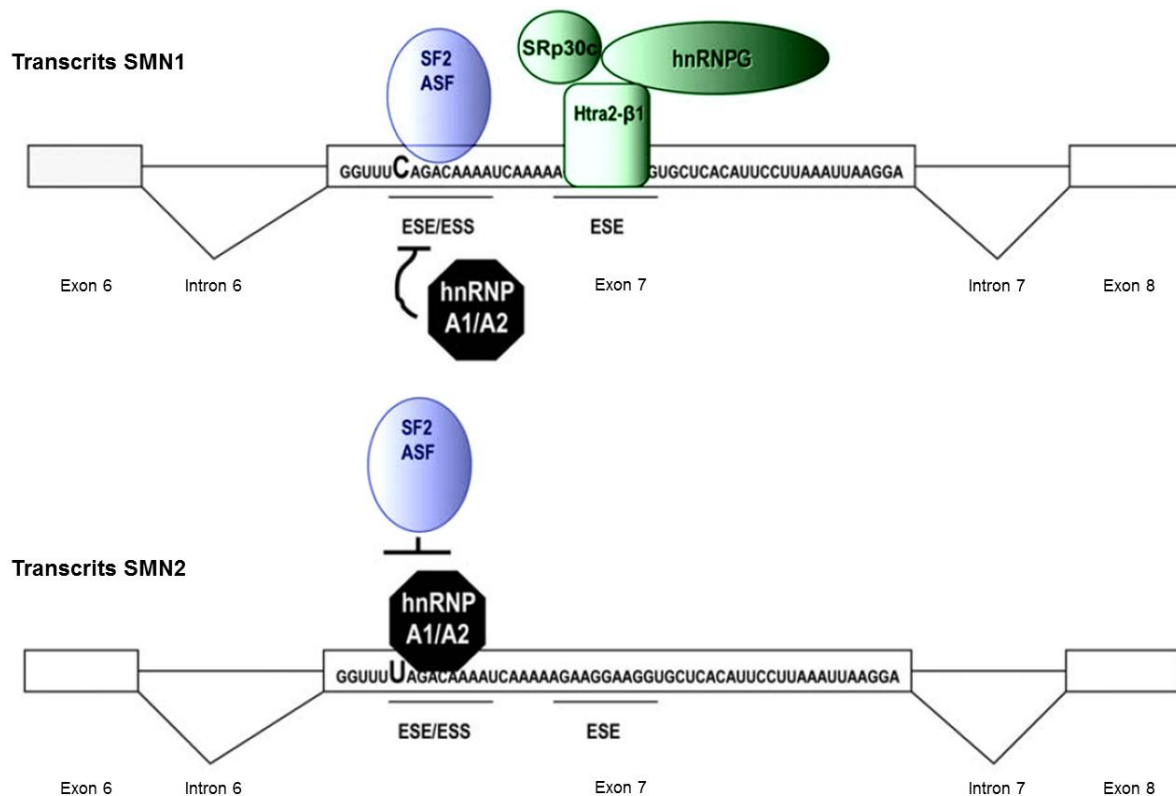


Figure 7 : épissages des transcrits SMN1 et SMN2
(Sumner, *J Child Neurol*, 2007)

Par ailleurs, dans la partie centrale de l'exon 7, un ESE riche en purine est reconnu par le facteur d'épissage de type SR Htra2-β1 et un certain nombre d'autres protéines d'épissage (SRp30c, hnRNP G, et RBM). On attribue à ces protéines un rôle dans l'inclusion de l'exon 7 et sont vraisemblablement responsables des 10% de transcrits SMN2 correctement épissés. De plus, il a été démontré que la surexpression de Htra2-β1 restaure ce même niveau à près de 80% (Hofmann et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; Hofmann et Wirth, *Hum Mol Genet*, 2002; Young et coll., *Hum Mol Genet*, 2002).

Il a été constaté que les 6 premiers nucléotides de la partie 3' de l'exon 7 constituaient également un site ESS. Cependant, aucun facteur d'épissage se liant à cet élément n'a été identifié pour le moment (Singh et coll., *RNA*, 2004; Biochem Biophys Res Commun, 2004).

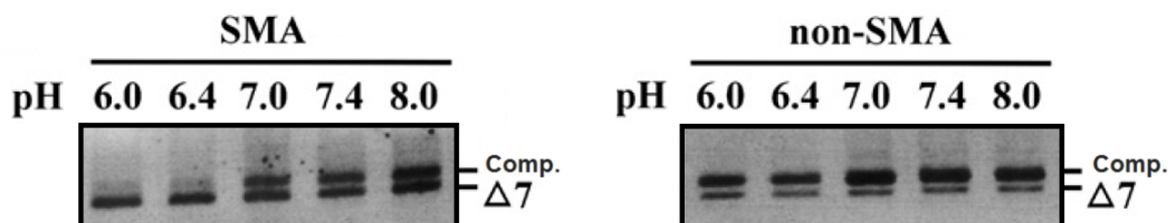


Figure 8 : influence de l'épissage de l'exon 7 par le pH extracellulaire. Des lignées de cellules lymphoïdes ont été incubées dans des milieux de pH différents pendant 24h. Les ARN ont ensuite été isolés et analysés par RT-PCR quantitative afin d'amplifier les transcrits complets (Comp.) et ceux ne possédant pas l'exon 7 (Δ7).

(Chen et coll., *Mol Cell Neurosci*, 2008)

En outre, il a été prouvé que les modifications de pH intracellulaire pouvaient moduler l'épissage de l'exon 7 du gène SMN2 dans les cellules de patients atteints de SMA (Fig. 8). En effet, un pH bas augmente l'excision de l'exon 7 ainsi que l'expression de hnRNP A1 et Sam68 ; alors qu'un pH élevé promeut l'inclusion de l'exon 7 (Chen et coll., *Mol Cell Neurosci*, 2008).

1.4.2. Structure du promoteur des gènes SMN

Les gènes SMN1 et SMN2 sont régulés par des promoteurs ayant des séquences et des activités quasi-identiques (Echaniz-Laguna et coll., *Am J Hum Genet*, 1999; Monani et coll., *Biochim Biophys Acta*, 1999). Une région de 150pb en amont du site d'initiation contient les séquences nécessaires pour une activité minimale du promoteur (Rouget et coll., *Biochem J*, 2005). Le promoteur de SMN contient des sites de liaisons pour CREB (c-AMP-Response Element Binding protein), les protéines de la famille Sp et le facteur de régulation de l'interféron. Toutes ces molécules sont capables de moduler l'activité du promoteur (Baron-Delage et coll., *Mol Med*, 2000; Majumder et coll., *J Biol Chem*, 2004).

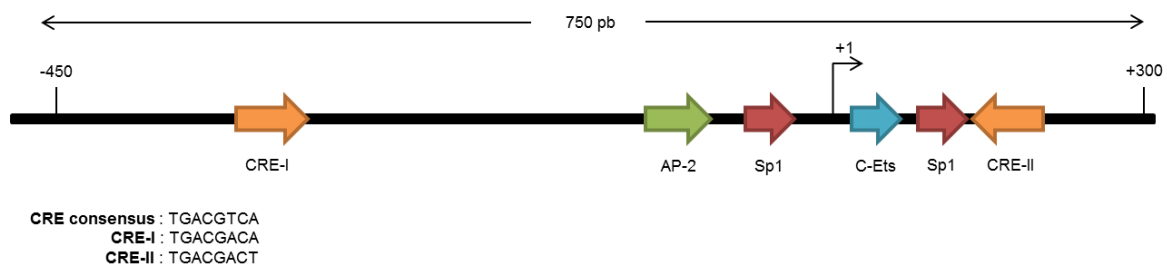


Figure 9 : diagramme schématisé de la région comprise entre -450 et +300 du promoteur du gène SMN2.

(Majumder et coll., *J Biol Chem*, 2004)

Plusieurs études ont conclu que le segment de 750pb, s'étendant entre -450 et +300 par rapport au site d'initiation, permettait l'activité transcriptionnelle maximale pour les gènes humains SMN1 et SMN2 (Monani et coll., *Biochim Biophys Acta*, 1999). L'analyse de cette même séquence a révélé de nombreux éléments *cis* pour différents facteurs de transcription, notamment deux sites de fixation pour CREB : CRE-I (-443 [...]TGACGACA[...] -332) et CRE-II (+210 [...]TGACGACT[...] +283) (Fig. 9). Il s'avère que le site CRE-II est essentiel pour l'expression du gène SMN (Majumder et coll., *J Biol Chem*, 2004). En effet, une mutation sur ce site entraîne une diminution drastique de l'activité du promoteur de SMN. Par ailleurs, il a été démontré par la même équipe, que la surexpression de la protéine CREB augmenterait de 4 fois l'activité de ce promoteur.

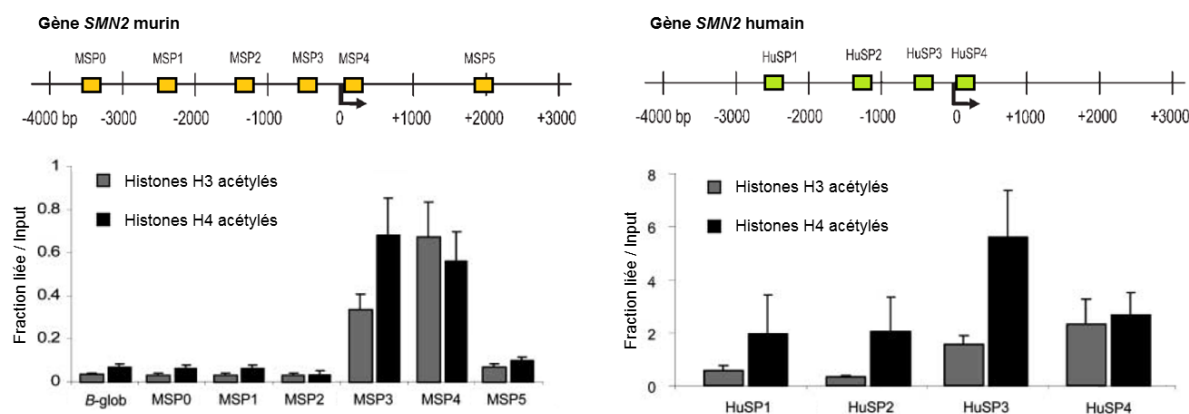


Figure 10 : acétylation des histones H3 et H4 sur le promoteur et le gène *SMN*. A, localisation schématisée des régions amplifiées par PCR quantitative sur les gènes *SMN* murin et humain. Les flèches indiquent les sites d'initiation de la transcription (+160pb chez la souris, +163pb chez l'humain). B, niveau d'acétylation des histones H3 et H4 chez des cellules de souris NSC34 et des fibroblastes issus de patients atteints de SMA de type I. Les barres d'erreur représentent l'écart moyen.

(Kernochan et coll., *Hum Mol Genet*, 2005)

Il a été démontré chez la souris que les régions entourant le site de départ de la transcription du gène *Smn* murin étaient fortement acétylées (Fig. 10). A l'inverse, les histones H3 et H4 sont hypo-acétylées dans la région du promoteur comprise entre -3,5 et -1,3 kb. Le profil d'acétylation est identique dans le gène *SMN2* humain : une forte acétylation de H3 et H4 autour du site de départ de la transcription et une hypo-acétylation dans la région du promoteur comprise entre -2,5 et -1,3 kb (Kernochan et coll., *Hum Mol Genet*, 2005).

1.4.3. Modulation de la sévérité de la SMA

Il existe d'autres mécanismes à l'origine des variations phénotypiques observées entre les différents types de SMA. Le premier d'entre eux est le rôle joué par le nombre de copies du gène *SMN2* (Burghes, *Am J Hum Genet*, 1997; Campbell et coll., *Am J Hum Genet*, 1997; Brahe, *Neuromuscul Disord*, 2000). Ainsi, il existe une corrélation significative entre le nombre de copies du gène *SMN2* et l'âge de début de la maladie, ainsi que la durée de survie des patients atteints de SMA (McAndrew et coll., *Am J Hum Genet*, 1997; Taylor et coll., *Eur J Hum Genet*, 1998; Petit et coll., *Muscle Nerve*, 2011). Le nombre de copies du gène *SMN2* sur le chromosome 5 peut varier de 0 à 6 et plus ce nombre est bas, plus le phénotype est sévère pour un individu présentant une délétion homozygote du gène *SMN1*. Par exemple, les patients présentant deux copies du gène *SMN2* ont des scores significativement plus faibles sur l'échelle de Hammersmith, évaluant les capacités motrices, comparés à ceux possédant trois copies (Tiziano et coll., *Neuromuscul Disord*, 2007). A noter qu'il a été constaté que le ratio des gènes *SMN1/SMN2* des parents de SMA de type II et type III est plus petits que ceux des parents de patient de type I dans les populations espagnole, américaine et canadienne (Velasco et coll., *Hum Mol Genet*, 1996; McAndrew et coll., *Am J Hum Genet*, 1997). Actuellement la détermination du nombre de copies de *SMN2* est réalisée par PCR quantitative (Anhuft et coll., *Hum Mutat*, 2003).

Ces observations sont à relier au phénomène de conversion génique très fréquent chez les patients de type III ou IV: le gène *SMN1* subit une mutation qui le convertit en *SMN2* (van der Steege et coll., *Am J Hum Genet*, 1996; Campbell et coll., *Am J Hum Genet*, 1997). Ce phénomène est particulièrement commun dans les populations noires africaines. En effet, il a été démontré que seulement 51% à 65% des patients SMA noirs en Afrique du sud avaient une délétion homozygote de gène *SMN1*, contre 95% chez les patients SMA blancs. La part des conversions géniques étant de 31,5% chez les patients noirs d'Afrique du sud (Stevens et coll., *Am J Med Genet*, 1999; Labrum et coll., *Neuromuscul Disord*, 2007).

Ethnie	1 copie	2 copies	3 copies
Pan-ethnique	1,7%	84,8%	13,5%
Caucasiens	2% - 2,7%	90,9% - 91%	6,3% - 7,1%
Juifs ashkenazes	1,3% - 2,2%	82,5% - 84,6%	14,1% - 15,3%
Asiatiques	1,6% - 1,8%	87,3% - 89,3%	9,1% - 10,9%
Indiens d'Asie	1,7%	82,8%	15,5%
Africains	1% - 1,1%	51,9% - 52,1%	46,8% - 47,8%
Hispaniques	0,8% - 1,3%	83,7% - 84,5%	14,8% - 15%

Tableau 10 : fréquence du nombre de copies de *SMN1* parmi différentes ethnies.

(Hendrickson et coll., *J Med Genet*, 2009; Sugarman et coll., *Eur J Hum Genet*, 2012)

En outre, les populations avec un grand nombre de copies de *SMN1* tendent à avoir moins de copies de *SMN2* (Ogino et coll., *Eur J Hum Genet*, 2003). Par conséquent, le risque d'occurrence de la SMA est diminué dans ces populations (Tab. 10).

La régulation transcriptionnelle est le deuxième mécanisme proposé pour expliquer les différentes sévérités observées chez les patients atteints de SMA. En effet, il a été démontré que les copies du gène *SMN2* ne sont pas équivalentes d'un patient à l'autre du point de vue fonctionnel. En effet, les quantités de protéine complète issues du gène *SMN2* sont très variables (Harada et coll., *J Neurol*, 2002). Par exemple, la substitution de base c.859G>C dans le gène *SMN2* a été identifiée chez différents patients. Ce simple changement crée une nouvelle séquence ESE qui augmente le nombre de transcrits complets, diminuant ainsi la sévérité du phénotype (Prior et coll., *Am J Hum Genet*, 2009). De plus, les copies du gène *SMN2* diffèrent d'un patient à l'autre par leur méthylation. Ainsi les porteurs de groupements méthyles sur les îlots CpG -290 et -296 sont plus atteints par la maladie (Hauke et coll., *Hum Mol Genet*, 2009).

Enfin, les délétions plus étendues sont plus fréquemment observées dans les formes aiguës de SMA (type I). En effet, de larges délétions emportant *SMN* et les deux gènes télomériques qui lui sont proches, *NAIP* et *p44*, sont observés chez 68% des patients atteints de formes sévères (Roy et coll., *Cell*, 1995; Burglen et coll., *Genomics*, 1996; Burlet et coll., *J Med Genet*, 1996). Le troisième mécanisme modificateur dans l'expression phénotypique de la maladie pourrait être la régulation des gènes *SMN* par des séquences voisines. De même, les gènes avoisinants *SMN* pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie de la maladie.

1.4.4. Gènes *NAIP* et *p44*

Le gène *NAIP* (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein) code une protéine à forte homologie avec une protéine prévenant l'apoptose chez les insectes (Roy et coll., *Cell*, 1995). La famille des protéines inhibitrices (Inhibitor of Apoptosis, ou IAP) est caractérisée par la présence d'une région aminoterminal de 1 à 3 domaines Baculovirus Inhibitor of apoptosis Repeats (ou BIR) (Uren et coll., *Trends Biochem Sci*, 1998) et leur action, mise en évidence dans des cultures de cellules neuronales, se traduit par des effets sur la différenciation et la survie des cellules (Liston et coll., *Nature*, 1996; Deveraux et Reed, *Genes Dev*, 1999; Gotz, *J Neural Transm Suppl*, 2000). En effet, la protéine *NAIP* est capable de protéger les neurones de la mort induite par le calcium en interagissant avec l'hippocalcine et peut aussi inhiber directement les caspases 3 et 7 (Mercer et coll., *Embo J*, 2000; Maier et coll., *J Neurosci*, 2002).

Le gène *NAIP*, voisin de *SMN*, est également dupliqué en miroir du côté centromérique du chromosome. Il a été constaté que le gène *NAIP* est supprimé chez 45-50% des patients atteints de SMA de type I et 18% atteints de SMA de type II (Roy et coll., *Cell*, 1995; Thompson et coll., *Nat Genet*, 1995; Spiegel et coll., *Schweiz Med Wochenschr*, 1996). Comme la protéine *NAIP* intervient dans le processus naturel de mort cellulaire programmé, son absence entraîne la survenue précoce de la mort motoneuronale et contribue donc à l'augmentation de la sévérité clinique de la maladie (Akutsu et coll., *Kobe J Med Sci*, 2002). Ainsi, un patient atteint d'une SMA avec une délétion homozygote du gène

NAIP présente environ cinq fois plus de risque d'avoir une forme de type I (Somerville et coll., *Am J Med Genet*, 1997). L'absence du gène *NAIP* n'a néanmoins pas pu être corrélée avec la durée de vie des patients, ni avec l'âge d'apparition des symptômes ; mais elle est corrélée avec la vitesse de détérioration des fonctions respiratoires (Taylor et coll., *Eur J Hum Genet*, 1998).

Le gène *p44* est voisin de *NAIP* en position télomérique. Il code l'une des sous-unités du complexe générale TFIIH (Burglen et coll., *Genomics*, 1996). Ce facteur de transcription joue un rôle dans la transcription, le contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Matsuno et coll., *Genes Cells*, 2007). Le gène *p44* est muté chez 15% des malades atteints de SMA, toutes formes confondues (Carter et coll., *Hum Mol Genet*, 1997). Cependant, aucune implication directe dans la pathologie n'a pu encore être décrite.

Des délétions ou interruptions de ces deux gènes à l'état homozygote ont été observées chez des patients sains d'un groupe contrôle. De plus, près de 27% des patients atteints de forme sévère présentent des délétions de petite taille emportant uniquement le gène *SMN*, ou bien encore uniquement des mutations intragéniques. Ces données suggèrent que les altérations de *NAIP* et de *p44* seules ne sont pas impliquées dans la survenue d'une SMA, mais que leur association avec une mutation du gène *SMN* pourrait aggraver la maladie.

1.5. Structure et fonction de la protéine SMN

La protéine SMN ne possède aucune homologie avec d'autres protéines connues. Elle est exprimée dans le noyau et le cytoplasme de différents types cellulaires. Il existe une corrélation entre le niveau d'expression de la protéine SMN et le phénotype des patients atteints de SMA (Liu et Dreyfuss, *EMBO J*, 1996; Lefebvre et coll., *Nat Genet*, 1997). En effet, les patients présentant une forme sévère ont un taux de protéine SMN compris entre 5 et 20% par rapport à une population contrôle. Pour environ 50% des patients atteints du type II ce taux est compris entre 30 et 80%. Par ailleurs, ces réductions du niveau d'expression de la protéine SMN sont non-corrélées avec l'étendue des altérations des gènes *NAIP* et *p44*.

1.5.1. Structure de SMN

SMN est une protéine composée de 294 acides aminés et d'environ 38kDa. Elle ne possède aucune homologie significative avec d'autres protéines déjà connues (Lefebvre et coll., *Cell*, 1995). Elle est à la fois codée par le gène *SMN1* et sa copie centromérique inversée *SMN2* (Covert et coll., *Hum Mol Genet*, 1997). La protéine SMN présente, par ailleurs, un domaine riche en proline : Pro5-X17-Pro10-X17-Pro5 (où X est un acide aminé quelconque) (Fig. 11). Ce motif symétrique est hautement conservé chez l'homme et chez la souris, suggérant un rôle majeur de cette région (Lefebvre et coll., *Cell*, 1995; DiDonato et coll., *Genome Res*, 1997). En plus de cette région polyproline codée par les exons 4 et 5, SMN possède différents motifs incluant : un domaine TUDOR codé par l'exon 3 et une région avec de multiples paires tyrosine-glycine, codées par l'exon 6 (Fig. 12).

l'exon 6 (Lorson et coll., *Nat Genet*, 1998; Young et coll., *Hum Mol Genet*, 2000). Les mutations qui interrompent l'homodimérisation et la formation du complexe multimérique exposent vraisemblablement les monomères mutants à la dégradation cellulaire via l'ubiquitination (Chang et coll., *Neurochem Int*, 2004). Ainsi les patients atteints de SMA de type I avec la mutation Y272C, qui perturbe l'oligomérisation, présentent les mêmes niveaux de SMN que les patients typiques atteints de SMA de type I ayant une perte complète de *SMN1* (Lefebvre et coll., *Nat Genet*, 1997).

1.5.2. Expression tissulaire et cellulaire

La protéine SMN a une localisation ubiquitaire : on la retrouve dans les reins, le foie, le cœur, le tissu musculaire, l'os, les lymphocytes... (Fig. 13). Elle est présente en grande quantité dans le cerveau (néocortex, hippocampe et cervelet) et la moelle épinière des mammifères (Battaglia et coll., *Hum Mol Genet*, 1997). Parmi les cellules du système nerveux central, on constate que SMN est fortement exprimée dans les larges motoneurons spinaux, les neurones du bulbe rachidien, les cellules pyramidales du cortex et les cellules de Purkinje du cervelet (Tizzano et coll., *Am J Pathol*, 1998). Cependant, il a été constaté que les différentes cellules n'avaient pas la même capacité à effectuer l'épissage de l'exon 7 du gène *SMN2*. Ainsi, les motoneurons expriment des niveaux beaucoup plus bas de protéine SMN complète provenant du gène *SMN2* comparé aux autres cellules de la moelle épinière, ce qui contribue à leur vulnérabilité dans un contexte de SMA (Ruggiu et coll., *Mol Cell Biol*, 2012).

La localisation de SMN est souvent très précise. Par exemple, on retrouve le complexe SMN, à la fois dans les muscles squelettiques et le cœur, au niveau des disques Z des myofibrilles (Walker et coll., *Hum Mol Genet*, 2008). Pour l'heure, le rôle exact de la protéine SMN dans les différents tissus et les mécanismes de son mode d'action ne sont pas encore élucidés. En outre, les facteurs de transcription pouvant se lier au promoteur du gène *SMN* varient en nombre et en nature suivant le type cellulaire considéré.

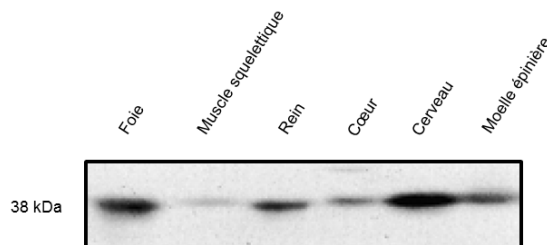


Figure 13 : niveaux de protéine SMN dans différents tissus. Les différents tissus analysés par western immunoblot proviennent d'un patient atteint de la myopathie de Duchenne, sauf pour le muscle squelettique qui provient d'un patient sain.

(Coovert et coll., *Hum Mol Genet*, 1997)

Chez les enfants atteints d'une forme sévère, le taux d'expression de la protéine SMN dans la moelle épinière est réduit à 1% de la valeur observée chez l'enfant sain, porteur ou non de la mutation du gène *SMN*. En outre, le déficit dans le foie ou l'os n'entraîne apparemment aucun trouble chez les patients atteints de SMA.

SMN est trouvée à la fois dans le noyau et le cytoplasme. Il semble que la localisation correcte de la protéine SMN soit dépendante de sa partie aminoterminal (Le et coll., *Neurogenetics*, 2000). La forme nucléaire est localisée dans des structures protéiques complexes appelées gems pour « gemini of the coiled bodies » (Liu et coll., *Cell*, 1997). Les gems font entre 0,1 et 1 μm de diamètre et apparaissent intimement liés aux corps de Cajal, aussi connus sous le nom de coiled bodies. Ces derniers ont été découverts par Ramon y Cajal (Ramón y Cajal, *Invest Biol*, 1903) ; ils varient en nombre en fonction du cycle et du type cellulaire et sont impliqués dans la transcription, l'épissage et la signalisation cellulaire (Andrade et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993; Matera, *Trends Cell Biol*, 1999; Gall, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000; Platani et coll., *Nat Cell Biol*, 2002).

Les analyses immunocytochimiques des fibroblastes de patients SMA ont montré une réduction significative du nombre de gems chez les patients de SMA de type I et une corrélation entre le nombre de gems et la sévérité clinique (Tab. 11 et fig. 14) (Coover et coll., *Hum Mol Genet*, 1997). Il a donc été confirmé que la capacité de SMN $\Delta 7$ à former des gems était grandement réduite. En conséquence, les deux conditions pour la stabilité des gems seraient d'une part l'oligomérisation des monomères de SMN et, d'autre part, leur capacité à se lier aux ribonucléoprotéines partenaires (Paushkin et coll., *Curr Opin Cell Biol*, 2002).

Phénotype	Nombre de noyaux	Noyaux avec gems	Nombre de gems	Gems/100 noyaux
Normal SMN ^{+/+} SMN2	520	260	568	113
Normal SMN ^{+/+} SMN2	504	125	262	52
SMA de type I	503	30	42	8
SMA de type II	503	64	114	23
SMA de type III	516	86	156	30

Tableau 11 : analyse du nombre de gems dans les fibroblastes en fonction du phénotype. (Coover et coll., *Hum Mol Genet*, 1997)

Les gems constituent un site de stockage pour les éléments du complexe d'épissage (Young et coll., *Exp Cell Res*, 2000). Il a été démontré dans des cellules de la lignée HeLa que la protéine SMN est co-localisée avec la coiline p80, un marqueur spécifique des corps de Cajal et semble s'y lier (Hebert et coll., *Genes Dev*, 2001). Cependant SMN ne semble pas indispensable à la formation des corps de Cajal. En effet, il existe des cellules où l'on observe des corps de Cajal mais ne présentant aucun gem (Young et coll., *Exp Cell Res*, 2000) et des corps de Cajal ont été mis en évidence dans les fibroblastes de patients atteints de SMA de type I, quasi-dépourvu de protéine SMN (Young et coll., *J Biol Chem*, 2002).

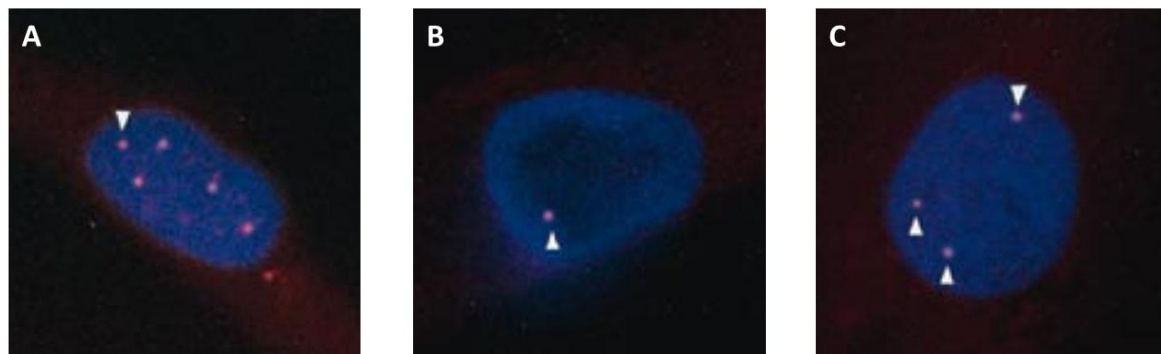


Figure 14 : analyse immunocytochimique du nombre de gems dans des fibroblastes issus de patient sain (A), atteint de SMA de type I (B) ou atteint de SMA de type II (C). Les noyaux sont marqués en bleu avec du DAPI et les gems en rouge avec un anticorps monoclonal anti-SMN.

(Coover et coll., *Hum Mol Genet*, 1997)

1.5.3. Expression dans le temps

Il a été démontré que la séquence et l'activité des promoteurs des gènes SMN1 et SMN2 étaient quasiment identiques (Echaniz-Laguna et coll., *Am J Hum Genet*, 1999; Monani et coll., *Biochim Biophys Acta*, 1999). Au cours de la différenciation cellulaire et du développement la transcription des gènes SMN est contrôlée par un élément en cis dans la région régulatrice du promoteur (Germain-Desprez et coll., *Gene*, 2001). Durant le développement fœtal la majorité de la protéine SMN exprimée est codée par SMN1. Puis, sa transcription diminue au fur et à mesure de la différenciation cellulaire et apparaît comme étant tissu spécifique (Soler-Botija et coll., *J Neuropathol Exp Neurol*, 2005).

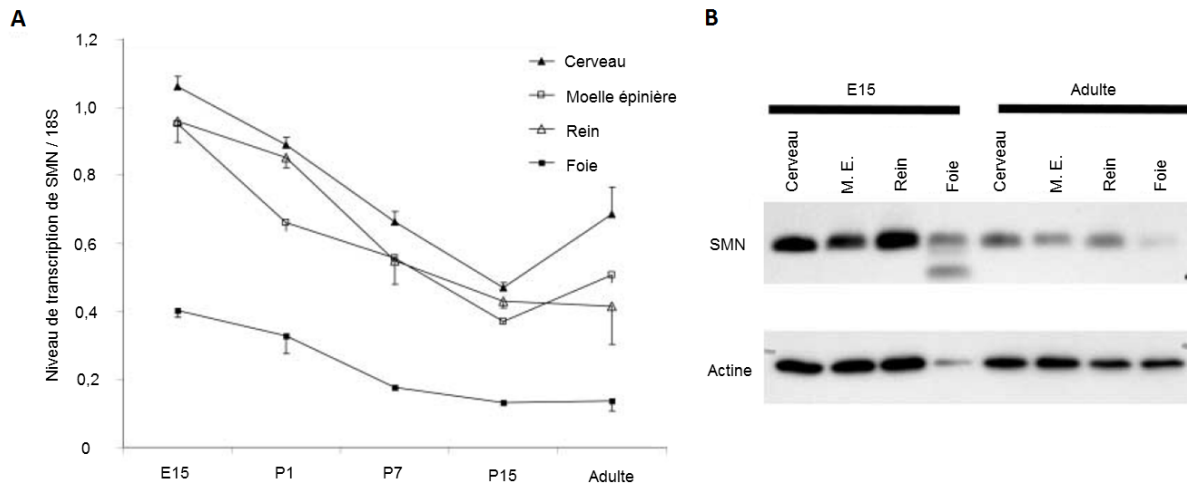


Figure 15 : expression de SMN en fonction du temps. A, analyse des niveaux de transcrits SMN par RT-PCR quantitative dans le cerveau, la moelle épinière, le rein et le foie au stade embryonnaire E15, aux stades postnatals P1, P7, P15 et adulte. Toutes les valeurs sont normalisées par l'expression des ARN 18S et les barres d'erreurs représentent l'écart moyen. B, Analyse par western immunoblot de l'expression de la protéine SMN et de l'actine dans le cerveau, la moelle épinière (M.E.), le rein et le foie au stade embryonnaire E15 et adulte.

(Kernochan et coll., *Hum Mol Genet*, 2005)

Le niveau d'expression de la protéine SMN varie en fonction des tissus (Liu et Dreyfuss, *EMBO J*, 1996) et diminue, globalement, de l'ontogénèse à l'âge adulte (Fig. 15) (Burlet et coll., *Hum Mol Genet*, 1998; Kernochan et coll., *Hum Mol Genet*, 2005). Au cours du développement embryonnaire, son rôle semble prépondérant dans le système nerveux central, les muscles, le cœur et les reins. La diminution de la protéine SMN est corrélée avec une diminution de ses transcrits : -66% pour le foie et -40% pour le cerveau entre E15 et l'âge adulte (Fig. 15). Dans les motoneurones, SMN est exprimée de manière très importante dès le deuxième trimestre de la vie embryonnaire ; ce qui suggère un rôle dans le développement et le maintien de ces cellules (Tizzano et coll., *Am J Pathol*, 1998).

1.5.4. Partenaires et fonctions de SMN

La grande majorité des protéines qui interagissent avec SMN, le font au niveau des gems ; c'est pourquoi elles ont hérité du nom des gemines (Fig. 16). Le numéro qui leur a été attribué correspond à l'ordre chronologique suivant lequel elles ont été découvertes.

1.5.4.1. Assemblage des snRNP

L'épissage des ARN pré-messagers est réalisé dans les noyaux, par des structures appelées small nuclear ribonucleoproteins (snRNP). Ces dernières sont formées d'au moins une séquence simple brin riche en uridine, nommé small nuclear RNA (snRNA), de protéines Sm et de polypeptides spécifiques (Mattaj et De Robertis, *Cell*, 1985). On dénombre 5 snRNA : U1, U2, U4, U5 et U6, ainsi que 7 protéines Sm : B/B', D1, D2, D3, E, F et G (Branlant et coll., *Embo J*, 1982; Reddy, *Nucleic Acids Res*, 1988). Ces protéines sont caractérisées par la présence de domaines riches en arginine et en glycine. Les résidus arginine sont di-méthylés symétriquement ce qui permet les interactions avec SMN (Friesen et coll., *Mol Cell*, 2001). L'ensemble des snRNP forme le spliceosome, le complexe excisant les introns et raboutant les exons des ARN pré-messagers. Par ailleurs, il a été démontré que le spliceosome était généré grâce à la collaboration entre les complexes PRMT5 et SMN (Fig. 17) (Chari et coll., *Cell*, 2008).

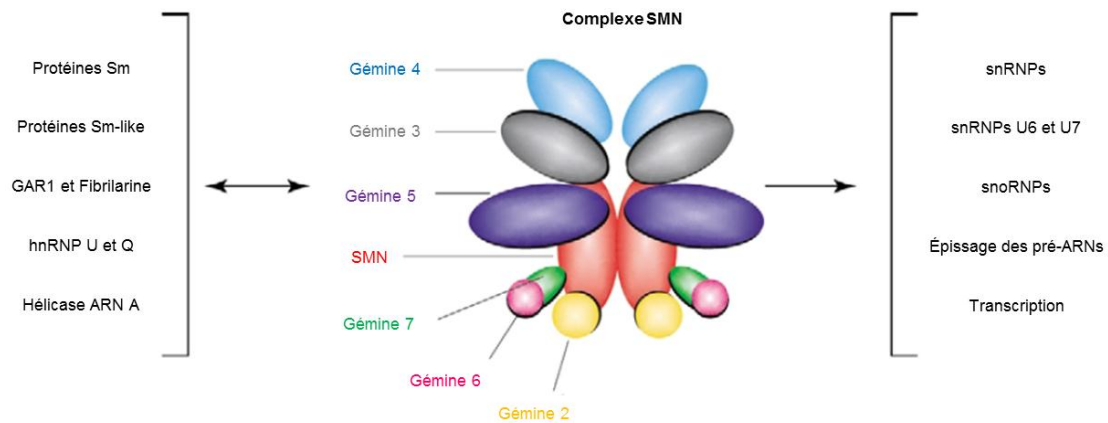


Figure 16 : complexe SMN et ses substrats. Les gémies 2, 3, 5 et 7 se lient directement à SMN, tandis que les gémies 4 et 6 sont associées au complexe via leur interaction directe avec la gémie 3 et 7 respectivement. Le complexe SMN interagit avec différentes cibles protéiques (panel de gauche) grâce à ses domaines riche en arginine et en glycine. Ces protéines cibles sont les composants de diverses particules ribonucléiques qui sont impliquées dans divers aspects du métabolisme des ARNs (panel de droite).

(Yong et coll., *Trends Cell Biol*, 2004)

La gémie 2, aussi appelée protéine SIP1 (SMN Interacting Protein 1), est capable de former un complexe stable, à la fois *in vivo* et *in vitro*, avec la protéine SMN (Liu et coll., *Cell*, 1997). Cette association peut avoir lieu dans le cytoplasme et dans les gems. De plus, il a été démontré par immunoprécipitation que les protéines Sm du cœur du spliceosome (B/B', D, E, F, G, U1A) peuvent interagir directement avec SMN ; ce qui semble confirmer le rôle de SMN dans la biogénèse des snRNP et/ou leur fonction (Latchman, *New Biol*, 1990; Friesen et Dreyfuss, *J Biol Chem*, 2000). Par ailleurs, la gémie 2 possède une très forte homologie de séquence avec la protéine Brr1 impliquée dans la biogenèse des snRNP chez *S. Cerevisiae* (Noble et Guthrie, *Embo J*, 1996, *Genetics*, 1996). Ainsi, la protéine SMN s'associe avec la gémie 2 via sa partie aminoterminal et se lie avec les snRNP grâce au domaine YG de sa partie carboxyterminale (Lorson et coll., *Nat Genet*, 1998). En outre, une fois oligomérisée, la protéine SMN crée un site de liaison de haute affinité pour les protéines Sm B, D1 et D3. De plus, la gémie 2 permet la stabilisation du complexe SMN (Ogawa et coll., *J Biol Chem*, 2007). La forme complète gémie 2 α est majoritaire et ubiquitaire chez les sujets sains (Aerbajinai et coll., *Int J Biochem Cell Biol*, 2002). Dans la SMA, la forme complète est moins exprimée et, en contrepartie, les formes résultant d'épissage alternatif aberrant gémie 2 β , 2 γ et 2 δ sont beaucoup plus présentes.

La gémie 3, parfois appelée dp 103, est une hélicase à ARN avec une boîte DEAD/DEAH. Elle est capable d'assembler et de séparer les éléments composant le spliceosome. Elle est capable d'interagir directement avec SMN grâce à sa partie carboxyterminale ainsi qu'avec les protéines Sm, telles B/B', D2 et D3 (Charroux et coll., *J Cell Biol*, 1999).

La gémie 4, bien qu'étant localisée au niveau des gems, n'interagit pas avec SMN. Elle semble jouer un rôle de cofacteur de l'activité ATPasique et/ou hélicase de la gémie 3.

La gémie 5, ou p175, peut se lier à SMN et interagir avec les protéines SmB, SmD1, SmD2, SmD3, and SmE (Gubitz et coll., *J Biol Chem*, 2002). Elle forme avec la gémie 2 et SMN un complexe multiprotéique qui s'assemble dans le cytoplasme puis qui est transloqué dans les gems dans le noyau. Ce complexe est impliqué dans la formation cytoplasmique, l'import dans le noyau et la régénération des snRNP.

La gémie 6 peut s'associer de façon spécifique avec les protéines B/B', D2, D3 et E, cependant sa fonction n'est pas encore élucidée. Elle est capable d'interagir également avec la gémie 7 liée à SMN (Baccon et coll., *J Biol Chem*, 2002).

La gémme 8, quant à elle, est la clef de voûte du complexe SMN. Elle maintient la stabilité de l'édifice en interagissant avec SMN et les hétérodimères gémme 6/7, ce qui permet la liaison efficace des protéine Sm et l'activité d'assemblage des snRNP (Carissimi et coll., *J Biol Chem*, 2006).

Toutes ces données suggèrent que SMN joue un rôle dans la biogenèse des snRNPs et du spliceosome, le complexe qui catalyse l'épissage des pré-ARNm. Il a été démontré que les snRNA riches en Uridine sont transcrits dans le noyau et, par la suite, transportés vers le cytoplasme où ils se rassemblent avec des protéines Sm pour former les particules snRNP (Fischer et coll., *Cell*, 1997; Pellizzoni et coll., *Cell*, 1998). Ainsi, après modification du m⁷ G-cap en m₃ G-cap, ces particules matures sont transportées, de nouveau, au noyau (Will et Luhrmann, *Curr Opin Cell Biol*, 2001). Afin de catalyser ce processus, les protéines Sm sont liées, dans un premier temps, au pICln, un composant du complexe PRMT5, qui réalise une diméthylation symétrique d'un sous-ensemble des protéines Sm. Dans un deuxième temps, les protéines Sm méthylées sont transférées sur le complexe SMN, qui favorise leur transfert sur les snRNA (Friesen et coll., *J Biol Chem*, 2002; Meister et Fischer, *EMBO J*, 2002).

Dans la SMA, les interactions entre SMN et les protéines Sm sont perturbées et peu fonctionnelles. En effet, ce sont les exons 6 et 7 du gène, où siègent la plupart des mutations retrouvées chez les patients atteints de SMA, qui codent les domaines de liaison de SMN aux protéines Sm (Pellizzoni et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999). De plus, il a été constaté que la mobilité des snRNPs augmentait en absence de SMN, ce qui altère la formation du spliceosome et ses interactions avec ses différents partenaires (Clelland et coll., *J Cell Sci*, 2012).

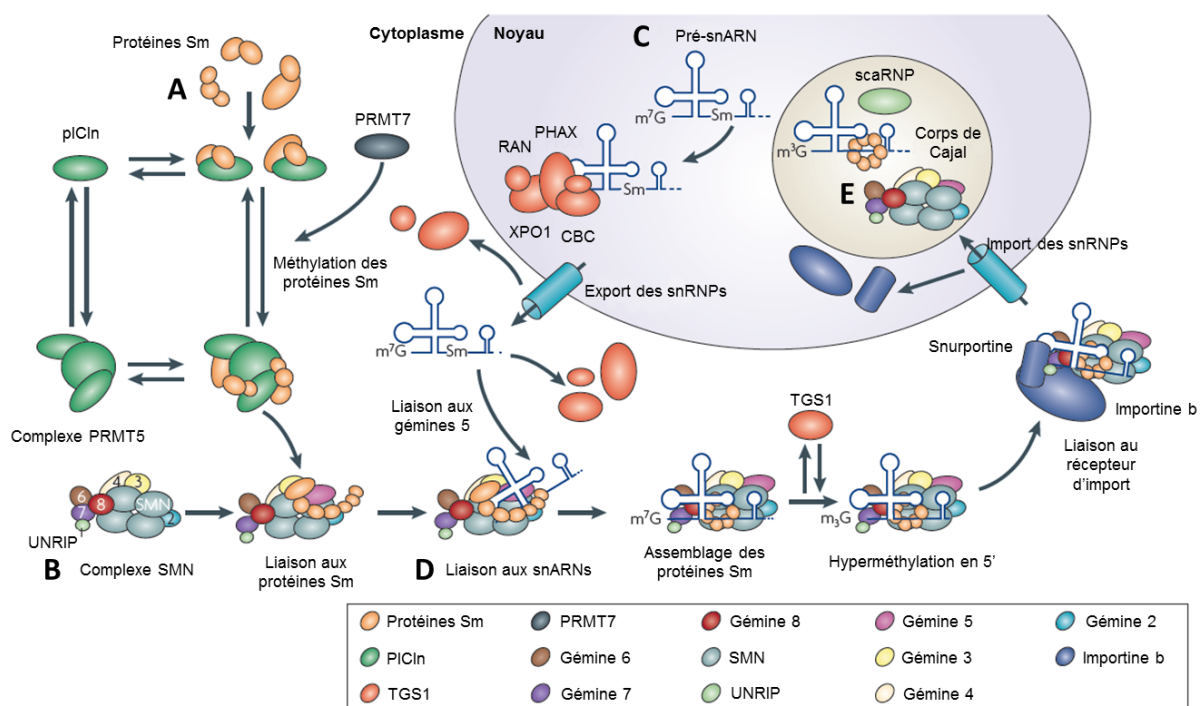


Figure 17 : fonction de SMN dans l'assemblage snRNP. A, dans le cytoplasme, les sept protéines Sm se lient à la protéine pICln. Celle-ci se lie aux protéines Sm et forme deux complexes distincts, avec SmB et SmD3 ou SmD1 et SmD2 puis se lie à SmE, SmF et SmG44. Les complexes PRMT5 et PRMT7 méthylent les protéines Sm ; celles-ci libérées se fixent au complexe SMN. B, le complexe SMN est composé de SMN oligomérisée, des gémines 2 à 8 et UNRIP. C, les snARNs transcrits dans le noyau se lient à PHAX, CBC, l'exportine XPO1 et RAN qui le transportent vers le noyau. Les snARNs sont introduits dans le complexe SMN par la liaison à la gémme 5. D, le complexe SMN place les protéines Sm sur les snARNs. La protéine TGS1 méthyle la partie 5' des snARNs, ce qui permet au complexe de se lier à la snurportine et l'importine. E, dans le noyau, le complexe SMN et les snRNPs se retrouvent dans les corps de Cajal.

(Burghes et Beattie, *Nat Rev Neurosci*, 2009)

1.5.4.2. Maturation des ARN messagers

La protéine SMN peut s'associer à des protéines de liaison de l'ARN ou directement lier l'ARN (Liu et Dreyfuss, *EMBO J*, 1996). Elle est indispensable pour l'assemblage des composants du spliceosome, aussi bien dans son étape de maturation cytoplasmique que nucléaire. De plus, SMN est capable de s'associer avec les protéines hnRNP-Q et hnRNP-R, qui se lient à certains pré-ARNm et ARNm. Ces deux groupes de snRNP sont impliqués dans la maturation, la stabilisation et le transport dans la cellule des ARNm et interviennent dans le recyclage d'autres snRNP (Dreyfuss et coll., *Annu Rev Biochem*, 1993; Burd et Dreyfuss, *Science*, 1994; Krecic et Swanson, *Curr Opin Cell Biol*, 1999; Shyu et Wilkinson, *Cell*, 2000; Jablonka et coll., *Hum Mol Genet*, 2001).

De plus, SMN interagit avec la fibrillarine et GAR1, modulant ainsi la biogenèse des petites ribonucléoprotéines nucléolaires (snoRNP). Ces dernières sont impliquées dans la maturation des ARN ribosomiaux (Pellizzoni et coll., *Curr Biol*, 2001).

1.5.4.3. Transcription

Il a été démontré que l'hélicase ARN A (RHA) formait un complexe avec SMN et se liait avec les ARN polymérase de type II (Pellizzoni et coll., *J Cell Biol*, 2001). En effet, la partie carboxy-terminale de l'ARN polymérase de type II, impliquée dans la transcription (Steinmetz, *Cell*, 1997), se lie physiquement dans le noyau à la protéine SMN, entre autre via la RHA. A noter que cette fonction est altérée chez les patients atteints de SMA. La protéine SMN Δ 7 entraîne une accumulation anormale de la forme hypophosphorylée de l'ARN polymérase de type II et de la RHA dans les gems et les corps de Cajal. Les auteurs ont conclu que ces résultats suggéraient un rôle du complexe SMN dans l'assemblage de la machinerie de transcription avant son association avec les gènes (Pellizzoni et coll., *J Cell Biol*, 2001).

1.5.4.4. Transport axonal et modification du cytosquelette

Malgré de vastes connaissances sur la biochimie de SMN, il est difficile de savoir comment une déficience de la biogenèse des snRNP, une fonction omniprésente dans tous les types de cellules, provoque spécifiquement la dégénérescence des motoneurones alpha. Ce constat soulève la question d'une éventuelle fonction supplémentaire de SMN limitée aux motoneurones alpha. Il a été démontré que SMN est localisée dans les dendrites et les axones ; suggérant, ainsi, un rôle dans le transport des ARN le long des axons (Bechade et coll., *Eur J Neurosci*, 1999; Pagliardini et coll., *Hum Mol Genet*, 2000). De plus, il a été observé que SMN était localisée dans des granules présents dans les neurites et les cônes de croissance dans des cultures de cellules neuronales (Fig. 18) (Fan et Simard, *Hum Mol Genet*, 2002). Ces granules ont des mouvements rapides et bidirectionnels, dépendant des microfilaments et des microtubules (Zhang et coll., *J Neurosci*, 2003).

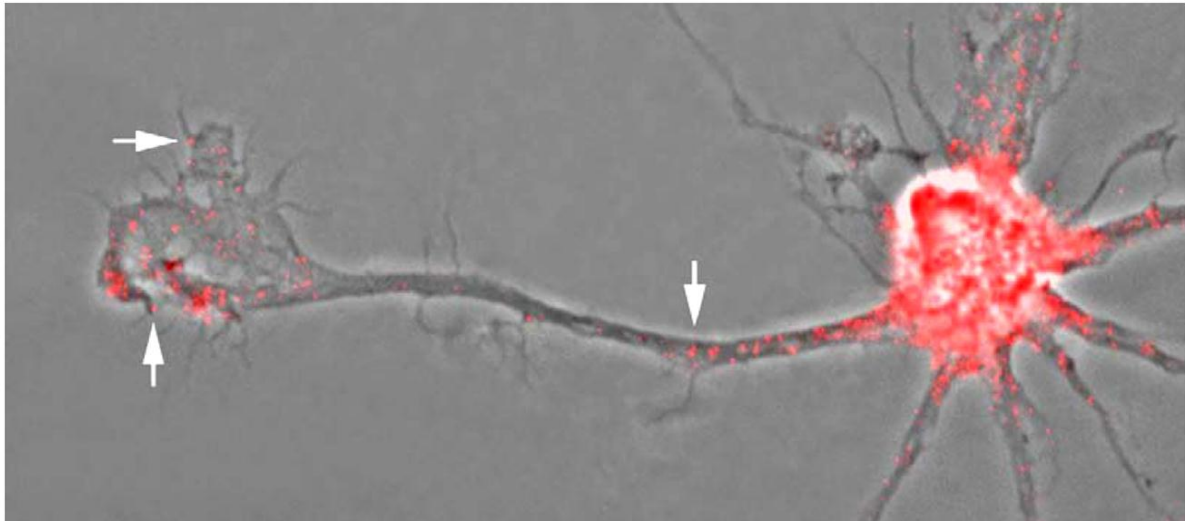


Figure 18 : localisation de la protéine SMN dans un neurone cortical de poulet. Le marquage nucléocytoplasmique est abondant et les flèches indiquent la présence de granules contenant SMN dans les neurites et le cône de croissance.

(Monani, *Neuron*, 2005)

L'idée d'un rôle spécifique de SMN dans le transport des ARNm est supportée par le fait que la protéine SMN est co-localisée avec les hnRNP-Q et R au niveau des gems, mais aussi au niveau des axones et des cônes de croissance (Rossoll et coll., *Hum Mol Genet*, 2002). Il a été démontré que l'ARNm de la β -actine se liait à l'hnRNP-R grâce à sa partie 3' non-traduite, ce qui permettait son transport le long de l'axone des motoneurones. Par conséquent, la protéine SMN jouerait un rôle majeur dans le transport axonal des ARNm. En outre, il est avéré que la protéine SMN Δ 7 ne peut agir avec les hnRNP-Q et R et en perturbe l'expression (Rossoll et coll., *J Cell Biol*, 2003).

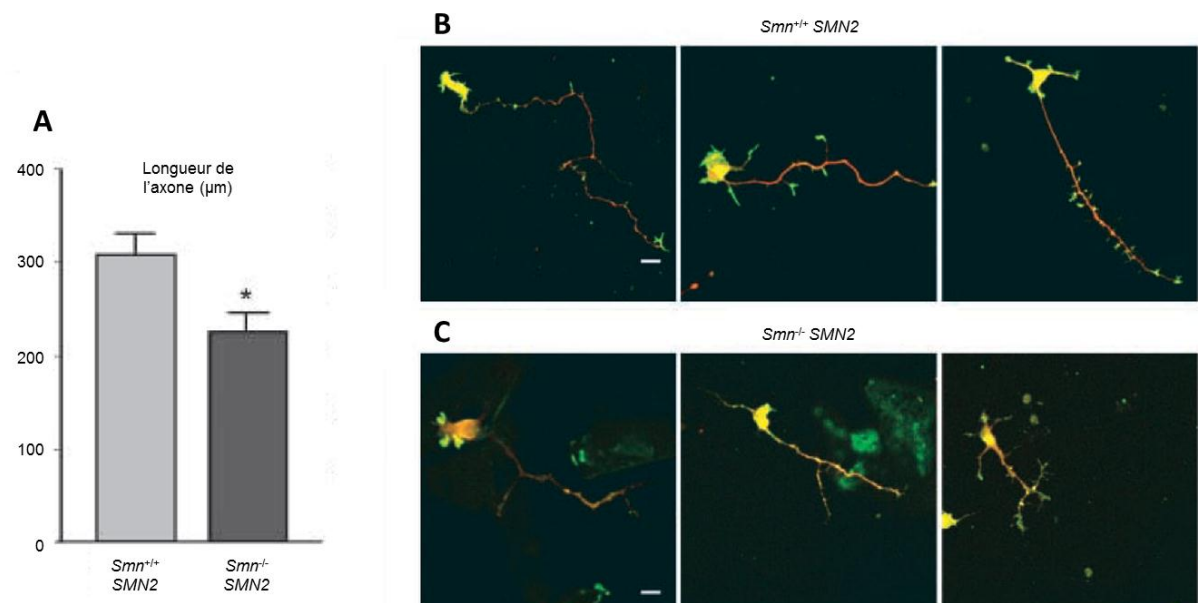


Figure 19 : croissance des neurites dans une culture primaire de motoneurones *Smn*^{+/+} SMN2 et *Smn*^{-/-} SMN2. A, longueur moyenne des axones des motoneurones après 5 jours en culture. Les motoneurones *Smn*^{-/-} SMN2 présentent une réduction de la croissance axonale (224,7 \pm 20,5 μ m vs. 307,6 \pm 23,1 μ m). B et C, Immunomarquage des axones de différents motoneurones *Smn*^{+/+} SMN2 (B) et *Smn*^{-/-} SMN2 (C) avec des anticorps anti-protéine MAP2 (vert) et anti-protéine tau (rouge). La barre d'échelle est égale à 20 μ m.

(Rossoll et coll., *J Cell Biol*, 2003)

En outre, la longueur des dendrites est sensiblement réduite dans différents modèles de souris transgéniques avec une réduction de SMN (Fig. 19) (Cifuentes-Diaz et coll., *Hum Mol Genet*, 2002; Rossoll et coll., *J Cell Biol*, 2003). Conformément à ces résultats chez la souris, l'invalidation de la protéine SMN par des morpholinos antisens dans des embryons de poisson-zèbre induit une importante dysmorphologie axonale. En effet, les axones ne parviennent pas à rejoindre la plaque motrice, ce qui suggère également un rôle important de la SMN dans le guidage axonal (McWhorter et coll., *J Cell Biol*, 2003). Les motoneurones cultivés à partir de souris SMA présentent un phénotype similaire avec des axones courts et des transports d'ARNm de la β -actine vers les cônes de croissance réduits (Rossoll et coll., *J Cell Biol*, 2003; Fallini et coll., *Brain Res*, 2012). Cependant, la surexpression de la partie C-terminale de SMN est capable de restaurer la croissance des neurites dans des cellules préalablement privées de SMN (van Bergeijk et coll., *FASEB J*, 2007).

Le domaine riche en proline de la protéine SMN complète est impliqué dans des interactions avec des profilines, de petites protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine (Giesemann et coll., *J Biol Chem*, 1999) ; par conséquent la privation de SMN augmente le ratio actine G/actine F (van Bergeijk et coll., *FASEB J*, 2007). Il a été également démontré que SMN pouvait former un complexe avec la plastine 3, une protéine qui stabilise l'actine filamentaire (Glenney et coll., *J Biol Chem*, 1981). Ainsi, il a été démontré que la déficience en SMN augmentait les niveaux de la protéine neuronale profiline II, conduisant à une diminution de l'activation de la plastine 3 et une activation inappropriée de la voie de signalisation RhoA/ROCK. Ce dérèglement modifie la dynamique de l'actine neuronale (Oprea et coll., *Science*, 2008; Bowerman et coll., *Hum Mol Genet*, 2010; Nolle et coll., *Hum Mol Genet*, 2011; Hao le et coll., *J Neurosci*, 2012). Ce phénomène pourrait jouer un rôle crucial dans la SMA, notamment dans le développement du système nerveux et la migration des neurones et des cellules gliales (Caraballo-Miralles et coll., *Mol Cell Neurosci*, 2012). Par ailleurs, un traitement oral au Y-27632 ou du Fasudil, des inhibiteurs de ROCK, augmente de manière significative la durée de vie, la maturation des jonctions neuromusculaires (JNMs) et la taille des fibres musculaires des souris mimant la SMA (Bowerman et coll., *Hum Mol Genet*, 2010; Bowerman et coll., *BMC Med*, 2012).

De même, il a été constaté *in vivo* et *in vitro* que la Stathmine, une protéine de déstabilisation des microtubules, était surexprimée dans les cellules privées de SMN (Wen et coll., *Hum Mol Genet*, 2010). Ce phénomène est corrélé avec le niveau d'expression de SMN : moins il y a de protéine SMN, plus la Stathmine est surexprimée et, donc, moins il y a de microtubules polymérisés. Ce dérèglement contribue au ralentissement des cônes de croissance et aux défauts de transport axonal.

1.5.4.5. Autres rôles

La protéine SMN est impliquée dans de très nombreux mécanismes cellulaires (Tab. 12). Par exemple, elle assure la fusion des myoblastes, l'intégrité des myotubes (Shafey et coll., *Exp Cell Res*, 2005) et contribue à la maturation des JNMs (Kariya et coll., *Hum Mol Genet*, 2008; Kong et coll., *J Neurosci*, 2009). Il a également été mis en évidence que SMN interagissait directement avec deux protéines impliquées dans le processus apoptotique : Bcl-2 (B-cell leukemia oncogene-2) et p53. Ce qui suggérerait que SMN pouvait jouer un rôle dans la survie cellulaire (Iwahashi et coll., *Nature*, 1997; Young et coll., *J Biol Chem*, 2002). Ce rôle a été confirmé ; il s'avère qu'une déplétion de la protéine SMN induit l'apoptose chez les cellules P19, des cellules souches transformées en cellules neuronales différenciées (Trulzsch et coll., *Brain Res Mol Brain Res*, 2004; Trulzsch et coll., *Brain Res*, 2007).

Partenaire de SMN	Interaction	Fonction	Références
Gémine 1 (SMN)	Directe	Biogenèse de snRNPs et épissage	(Lorson et coll., <i>Nat Genet</i> , 1998)
Gémine 2 (SIP 1)	Directe	Biogenèse de snRNPs et épissage	(Liu et coll., <i>Cell</i> , 1997)
Gémine 3 (DP 103)	Directe	Biogenèse de snRNPs et épissage	(Campbell et coll., <i>Eur J Immunol</i> , 2000)
Gémine 4 (GIP1)	Indirecte	Biogenèse de snRNPs et épissage	(Charroux et coll., <i>J Cell Biol</i> , 2000)
Gémine 5 (p175)	Directe	Biogenèse de snRNPs et épissage	(Gubitzi et coll., <i>J Biol Chem</i> , 2002)
Gémine 6	Indirecte	Biogenèse de snRNPs et épissage	(Pellizzoni et coll., <i>J Biol Chem</i> , 2002)
Gémine 7	Directe	Biogenèse de snRNPs et épissage	(Baccon et coll., <i>J Biol Chem</i> , 2002)
Gémine 8	Indirecte	Biogenèse de snRNPs et épissage	(Carissimi et coll., <i>J Biol Chem</i> , 2006)
Protéines Sm	Directe	Biogenèse de snRNPs et épissage	(Liu et coll., <i>Cell</i> , 1997)
LSm4	Directe	Biogenèse de snRNPs et épissage	(Friesen et Dreyfuss, <i>J Biol Chem</i> , 2000)
U1-A, U2-A'	?	Biogenèse des snRNPs	(Liu et coll., <i>Cell</i> , 1997)
Galectine 1 et 3	Indirecte	Biogenèse de snRNPs et épissage	(Park et coll., <i>Nucleic Acids Res</i> , 2001)
Fibrillarine	Directe	Assemblage des snoRNPs	(Jones et coll., <i>J Biol Chem</i> , 2001)
GAR1	Directe	Assemblage des snoRNPs	(Pellizzoni et coll., <i>Curr Biol</i> , 2001)
Coiline	Directe	Recrutement de SMN (Corps de Cajal)	(Hebert et coll., <i>Genes Dev</i> , 2001)
Profiline	Directe	Contrôle de la dynamique de l'actine	(Giesemann et coll., <i>J Biol Chem</i> , 1999)
ZPR1	Directe	Apoptose et biogenèse des snRNPs	(Gangwani et coll., <i>Nat Cell Biol</i> , 2001)
OSF	Directe	Formation des ostéoclastes	(Kurihara et coll., <i>J Biol Chem</i> , 2001)
FGF-2	Directe	Facteur neurotrophique	(Claus et coll., <i>J Biol Chem</i> , 2003)
Nucleoline et B23	Indirecte	Croissance cellulaire et apoptose	(Lefebvre et coll., <i>Hum Mol Genet</i> , 2002)
ARN hélicase A	Directe	Transcription	(Pellizzoni et coll., <i>J Cell Biol</i> , 2001)
ARN polymérase II	Indirecte	Transcription	(Pellizzoni et coll., <i>J Cell Biol</i> , 2001)
mSin3A	?	Régulation de la transcription	(Zou et coll., <i>J Biol Chem</i> , 2004)
EWS	Directe	Régulation de la transcription	(Young et coll., <i>Brain Res Mol Brain Res</i> , 2003)
FUSE-binding prot.	Directe	Régulation de la transcription	(Williams et coll., <i>FEBS Lett</i> , 2000)
hnRNPQ et R	Directe	Transport axonal	(Rossoll et coll., <i>Hum Mol Genet</i> , 2002)
hsp70	?	Transport de protéine	(Meister et coll., <i>EMBO J</i> , 2001)
Snurportine	Directe	Transport des snRNPs au noyau	(Narayanan et coll., <i>Hum Mol Genet</i> , 2002)
Importine β	Indirecte	Transport des snRNPs au noyau	(Narayanan et coll., <i>Hum Mol Genet</i> , 2002)
p53	Directe	Apoptose	(Young et coll., <i>J Biol Chem</i> , 2002)
Bcl-2	Directe	Anti-apoptose	(Iwahashi et coll., <i>Nature</i> , 1997)
ISG20	?	Dégradation des ARN monocathénaires	(Espert et coll., <i>J Cell Biochem</i> , 2006)
Rpp20	Directe	Maturation des ARN	(Hua et Zhou, <i>Biochem Biophys Res Commun</i> , 2004)
Papilloma Virus E2	Directe	Activation de la transcription nucléaire	(Strasswimmer et coll., <i>Hum Mol Genet</i> , 1999)
Virus NS1 et NS2	?	Réplication virale	(Young et coll., <i>J Virol</i> , 2002)
Epstein-Barr	?	Régulation de la transcription	(Krauer et coll., <i>Virology</i> , 2004)

Tableau 12 : liste des différents partenaires de SMN et leurs fonctions.

(Wirth et coll., *Semin Pediatr Neurol*, 2006; Rossoll et Bassell, *Results Probl Cell Differ*, 2009)

1.6. Diagnostic et prises en charge des symptômes

1.6.1. Diagnostic

Le diagnostic, guidé par l'analyse clinique, est devenu moléculaire. La mutation du gène causal est recherchée sur l'ADN à partir d'un prélèvement de sang ou de salive. Cette technique, simple, rapide et fiable dans presque la totalité des cas, a supplanté tous les autres moyens de diagnostic, telles les biopsies et électromyographies.

Par ailleurs, un test prénatal est souvent requis pour les parents d'un enfant atteint de SMA voulant un deuxième enfant, les personnes ayant des parents proches atteints par la SMA ou, enfin, pour les couples composés d'un patient affecté par la SMA, souvent de type III, et un porteur hétérozygote. Ce test est basé sur des échantillons provenant du chorion entre la 10^e et la 12^e semaine de gestation ou provenant du liquide amniotique entre la 14^e et la 16^e semaine de gestation.

1.6.2. Prises en charge

Pour l'heure, il n'existe aucun traitement de la maladie. Néanmoins, une prise en charge pluridisciplinaire, quotidienne et adaptée à chaque cas, s'adressant à l'enfant, sa famille et son entourage, permet une nette amélioration du pronostic vital (Tab. 13). Les cliniciens mettent l'accent sur une prise en charge respiratoire et orthopédique. Il est

important qu'une évaluation globale soit réalisée tous les 6 mois, voire plus fréquemment pour les enfants atteints de types sévères.

Prise en charge	SMA peu sévère	SMA sévère	Références
Respiratoire	Exercices d'assouplissement des poumons et du thorax, ventilation dans les narines ou par un masque	Trachéotomie, drainage des sécrétions bronchiques, antibiotiques appropriés	(Samaha et coll., <i>J Child Neurol</i> , 1994; Bach et coll., <i>Pediatr Pulmonol</i> , 2002; Ryan, <i>Paediatr Respir Rev</i> , 2008; Ishikawa et Bach, <i>Eur J Phys Rehabil Med</i> , 2010)
Musculaire et orthopédique	Kinésithérapie motrice, déambulateur	Kinésithérapie motrice, orthèses (coque, corsets, minerves...), fauteuil roulant, interventions chirurgicales (correction de scoliose...)	(Brown et coll., <i>Spine (Phila Pa 1976)</i> , 1989; Merlini et coll., <i>Dev Med Child Neurol</i> , 1989; Rodillo et coll., <i>J Child Neurol</i> , 1989; Granata et coll., <i>Neuromuscul Disord</i> , 1993; Bruce et coll., <i>Lancet</i> , 1995; Tein et coll., <i>Pediatr Neurol</i> , 1995; Fujak et coll., <i>Disabil Rehabil Assist Technol</i> , 2011)
Nutritive	Compléments alimentaires	Gastrotomie	(Chen et coll., <i>J Pediatr</i> , 2011)
Psychologique	En fonction des cas. Soutien des proches, intervention d'un psychologue		(Benony et coll., <i>Ann Med Psychol</i> , 2004)

Tableau 13 : récapitulatif des différentes prises en charge de la SMA.

1.7. Approches thérapeutiques et traitements cliniques

La dernière décennie a été témoin de plusieurs grands projets de développement de médicaments visant à traiter la SMA. Ces projets se sont principalement basés sur les tests de petites molécules candidates pouvant augmenter les niveaux de protéine SMN dans des cultures de cellules. Par la suite les composés augmentant de manière significative SMN ont été testés dans des modèles animaux mimant la SMA, puis sur des patients consentants. Cependant, en dépit des résultats favorables dans les modèles murins, les essais cliniques de plusieurs de ces agents, notamment le phénylbutyrate, l'acide valproïque, et l'hydroxyurée ont été décevants et demeurent sans aucun bénéfice substantiel clinique. Malgré de multiples questions liées à la durée du traitement et le calendrier de la thérapie, des essais avec plusieurs de ces agents sont actuellement en cours (Tab. 14).

Traitement	Type de SMA	Nombre de patients	Age des patients	Durée du traitement	Paramètres enregistrés
Riluzole	II et III	141	6 – 20 ans	Janvier 2006 – décembre 2009	Motricité et fonctions pulmonaires
Hydroxyurée	II et III	60	> 4 ans	Juin 2007 – juin 2009	Niveau d'ARN et protéine SMN, motricité et fonctions pulmonaires
Oléoxime	II et III	150	3 – 25 ans	2010 – 2013	Motricité, fonctions pulmonaires et EMG
Acide valproïque et Carnitine	I	36	2 – 12 ans	Avril 2008 – juin 2010	Niveau d'ARN et protéine SMN, motricité, EMG et durée de vie
Acide valproïque	III	33	18 - 60 ans	Juillet 2007 – décembre 2009	Force musculaire et fonctions pulmonaires
Sodium Phenylbutyrate	I et II	12	0 – 6 mois	Juillet 2007 – décembre 2011	Motricité et niveau de SMN

Tableau 14 : derniers essais cliniques sur des patients atteints de SMA.

(Pruss et coll., *Future Med Chem*, 2010)

Le développement d'une thérapie pour les patients atteints de SMA reste donc un défi exceptionnel pour la communauté scientifique. Les stratégies de recherche actuelles se basent sur l'augmentation de l'expression du gène *SMN2*, la modification de l'épissage des transcrits *SMN2*, la stabilisation de la protéine SMN, les thérapies géniques visant à

réintroduire le gène correct, les thérapies cellulaires visant à remplacer les cellules défaillantes et l'activation des mécanismes de neuroprotection (Sumner, *J Child Neurol*, 2007).

1.7.1. Augmentation de l'expression de SMN2

La sévérité de la maladie est directement corrélée au niveau d'expression du gène SMN2. Ainsi plus il y a de protéine SMN chez les patients ou dans le modèle animal plus les capacités motrices sont conservées et la durée de vie allongée.

1.7.1.1. Les composés régulant l'acétylation et/ou la méthylation

Lorsque la partie aminoterminal du cœur des histones est acétylée, la région contenant la chromatine avoisinante se décondense. Par conséquent, cette partie de l'ADN est plus accessible pour la machinerie de transcription. Les niveaux d'acétylation des histones sont contrôlés d'une part, via les protéines histone-acétyltransférases qui acétylent les histones, et d'autre part, via les histone-déacéthylases (HDAC) qui les déacétylent et limitent donc la transcription des gènes (Allfrey, *Proc Can Cancer Conf*, 1966; Jenuwein et Allis, *Science*, 2001). Or, il a été démontré que les HDACs 1 et 2 étaient capables d'interagir avec le promoteur des gènes SMN (Kernochan et coll., *Hum Mol Genet*, 2005). C'est pourquoi, l'inhibition ciblée des HDACs constitue une piste pour développer un traitement contre la SMA.

Le sodium butyrate est un inhibiteur des HDACs. Il a été démontré que celui-ci augmentait l'expression du gène SMN2 dans un modèle souris mimant la SMA (Hsieh-Li et coll., *Nat Genet*, 2000) et dans des cellules lymphoblastiques de patient atteint de SMA de type I. Par conséquent, la protéine SMN complète et stable est augmentée avec cette molécule. De plus, les symptômes des souriceaux mimant la SMA sont atténués lorsque la souris mère a reçu du sodium butyrate par administration orale durant la gestation (Chang et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001).

Le phénylbutyrate est également un inhibiteur des HDACs couramment utilisé chez les patients présentant des troubles du cycle de l'acide urique. Il est capable d'augmenter l'expression du gène SMN2 *in vitro* dans des fibroblastes de patients (Andreassi et coll., *Eur J Hum Genet*, 2004) et son administration orale augmente l'expression de SMN dans les lymphocytes (Brahe et coll., *Eur J Hum Genet*, 2005). Une étude pilote sur le traitement au phénylbutyrate a été réalisée avec des patients atteints de SMA pendant neuf semaines. Une augmentation significative du score sur l'échelle d'Hammersmith, mesurant les fonctionnalités motrices, a été enregistrée (Main et coll., *Eur J Paediatr Neurol*, 2003; Mercuri et coll., *Neuromuscul Disord*, 2004). Cependant, lors d'une deuxième étude, basée sur un régime intermittent de 500mg/kg de phénylbutyrate pendant 7 jours, suivi de 7 jours sans traitement, aucune augmentation fonctionnelle significative n'a été décelée chez les 107 patients atteints de SMA de type II (Mercuri et coll., *Neurology*, 2007).

Il a été démontré que la trichostatine A (TSA), un autre inhibiteur des HDACs, est capable d'augmenter *in vitro* l'activité du promoteur de SMN2 dans une lignée de motoneurons transgéniques (Jarecki et coll., *Hum Mol Genet*, 2005) et dans des fibroblastes issus de patients atteints de SMA de type III (Avila et coll., *J Clin Invest*, 2007). Une seule injection intrapéritonéale de TSA 10mg/kg chez des souris transgéniques ou mimant la SMA est capable d'accroître l'acétylation des histones H3 et H4 et d'augmenter modestement l'expression du gène SMN. Des injections quotidiennes sont, quant à elles, capables d'augmenter considérablement les niveaux de transcrit et protéine SMN dans le tissu nerveux et les muscles de souris mimant la SMA. De plus, ce traitement allonge la durée de vie et les capacités motrices de ces souris (Avila et coll., *J Clin Invest*, 2007; Bosch-Marce et coll., *Hum Mol Genet*, 2011). Récemment il a été démontré que la TSA

combinée au Bortezomib (Velcade®), un inhibiteur du protéasome donc de la dégradation de SMN, augmentait d'autant plus la durée de vie des souris mimant la SMA (Kwon et coll., *Hum Mol Genet*, 2011).

L'acide hydroxyamique Suberoylanilide (SAHA), un inhibiteur des HDACs déjà utilisé dans le traitement de cancer, est capable d'augmenter l'expression des gènes *SMN* dans des tranches d'hippocampe de rat et des coupes de cerveau humain (Hahnen et coll., *J Neurochem*, 2006). Ce composé décondense l'ADN du promoteur du gène *SMN2* par deux mécanismes synergiques : d'une part l'acétylation des histones et d'autres part la déméthylation de la chromatine (Hauke et coll., *Hum Mol Genet*, 2009). Par ailleurs, le SAHA améliore le phénotype des souris mimant la SMA. Dans le modèle mimant la SMA de type I (Monani et coll., *Hum Mol Genet*, 2000), le traitement des mères durant la gestation empêche la mortalité embryonnaire et les souriceaux résultants vivent plus longtemps. Dans le modèle mimant la SMA de type II (Hsieh-Li et coll., *Nat Genet*, 2000), le traitement quotidien avec 25mg/kg de SAHA augmente la survie de 30%, réduit la perte des motoneurons, augmente la taille des jonctions neuromusculaires et des fibres musculaires (Riessland et coll., *Hum Mol Genet*, 2010; Mutsaers et coll., *Hum Mol Genet*, 2011).

L'acide valproïque (AVP) est un anti-convulsant et stabilisateur d'humeur utilisé dans le traitement de l'épilepsie. Il est capable de décompacter l'ADN en inhibant les HDACs et, également, en augmentant l'activité des déméthylases (Detich et coll., *J Biol Chem*, 2003). Il a été démontré *in vitro* que l'AVP prévenait la mort des neurones corticaux de rat (Jeong et coll., *FEBS Lett*, 2003) et *in vivo* que l'AVP augmentait la régénération du nerf sciatique chez les rats adultes après une axotomie (Cui et coll., *Brain Res*, 2003). En parallèle, il a été démontré que l'AVP augmentait le niveau de protéine SMN dans des cultures de fibroblastes de patients atteints de SMA (Brichta et coll., *Hum Mol Genet*, 2003; Sumner et coll., *Ann Neurol*, 2003). De même, l'AVP augmente ce niveau dans la moelle épinière de souris mimant la SMA ce qui déclenche une atténuation de la perte des motoneurons et une correction partielle des fonctions motrices (Tsai et coll., *Neurobiol Dis*, 2006). Une étude, portant sur 10 porteurs hétérozygotes de la mutation de *SMN*, 5 patients atteints de SMA de type I, 11 de type II et 4 de type III, traités avec 1200-1800 mg d'AVP/jour, sur 5 semaines, a montré une augmentation de l'expression de SMN sur 7 des 10 porteurs sains et sur 7 des 20 patients (Brichta et coll., *Ann Neurol*, 2006). De plus, il a été démontré sur 7 patients atteints de SMA de type III et IV traités avec 500-1000 mg d'AVP/jour, sur une durée moyenne de 8 mois, que l'AVP induisait une augmentation de la force musculaire et des capacités motrices (Weihl et coll., *Neurology*, 2006). Cependant, les études suivantes avec de plus larges cohortes de patients se sont révélées décevantes. Les améliorations sont presque entièrement limitées aux patients de très jeunes âges (Swoboda et coll., *J Child Neurol*, 2007; Swoboda et coll., *PLoS One*, 2009; Swoboda et coll., *PLoS One*, 2010; Darbar et coll., *BMC Neurol*, 2011).

1.7.1.2. Autres substances

L'Hydroxyurée est connue pour servir de médiateur afin d'activer l'expression du gène de la globine foétale (Steinberg, *Semin Hematol*, 1997; Stevens, *J Biol Regul Homeost Agents*, 1999). Elle est utilisée pour traiter des patients atteints de drépanocytose et de thalassémie. Cependant, il a été démontré que l'hydroxyurée pouvait aussi augmenter *in vitro* l'expression du gène *SMN* via un relargage d'oxyde nitrique et du nombre de gems dans des fibroblastes et lymphocytes de patients atteints de SMA (Grzeschik et coll., *Ann Neurol*, 2005; Xu et coll., *Neurogenetics*, 2011). Cette molécule étant déjà approuvée (Food and Drug Administration Approved), elle a pu être testée cliniquement très rapidement. L'hydroxyurée a permis d'augmenter la quantité de protéine SMN et les fonctions motrices chez plusieurs patients atteints de SMA de type II et III (Wang et coll., *Families of Spinal Muscular Atrophy*, 2006; Liang et coll., *J Neurol Sci*, 2008).

La piperidine 2,4 diaminoquinazole (D156844) est un composé qui double *in vitro* l'activité du promoteur de *SMN2* dans des fibroblastes de patients atteints de SMA (Thurmond et coll., *J Med Chem*, 2008). Cette augmentation est, encore une fois, associée à une hausse de la protéine SMN et du nombre de gems. Son administration orale par des souris *SMNΔ7* mimant la SMA, déclenche également un surcroît d'activité du promoteur de manière dose-dépendante dans la moelle épinière. La durée de vie de ces souris traitées au D156844 est allongée de 21-30% quand le traitement est donné avant la perte des motoneurones (Butchbach et coll., *Hum Mol Genet*, 2010).

1.7.2. Modification de l'épissage alternatif

La modification de l'épissage des transcrits, issus du gène *SMN2*, est une autre stratégie prometteuse. Cette stratégie est basée sur des molécules capables de stimuler spécifiquement l'inclusion de l'exon 7 dans les ARNm issus du gène *SMN2* et ainsi augmenter la quantité de protéine SMN fonctionnelle.

1.7.2.1. Les inhibiteurs d'HDACs

Le sodium butyrate change également le profil d'épissage du gène *SMN2*. En effet, l'exon 7 est inclus aussi souvent que dans les transcrits provenant de *SMN1*, dans les cultures de cellules lymphoblastiques de patients atteints de SMA de type I traitées. En revanche, le profil d'épissage des exons 3 et 5 ne change pas (Chang et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001).

Le VPA augmente le niveau d'expression du facteur d'épissage Htra2- β 1, ce qui facilite l'épissage correct des ARN provenant du gène *SMN2*. Ainsi le niveau d'ARN complets aboutissant à la protéine SMN fonctionnelle est multiplié par 2 à 4 fois dans des cultures de fibroblastes de patients atteints de SMA (Brichta et coll., *Hum Mol Genet*, 2003).

De même, il a été démontré que le M344, un inhibiteur des HDACs de type benzamide, augmentait le niveau d'Htra2- β 1. Par conséquent, il multiplie par 7 l'expression du gène *SMN2* dans des cultures de fibroblastes provenant de patients atteints de SMA (Riessland et coll., *Hum Genet*, 2006). Cependant peu d'études ont été menées sur ce composé à cause de sa toxicité.

1.7.2.2. Les petits ARN antisens

Une modulation spécifique de l'épissage de l'exon 7 a été réalisée grâce à des petits ARN antisens qui vont se lier au gène *SMN2*. Ces derniers vont soit mimer le rôle des protéines SR et empêcher l'épissage de l'exon (Cartegni et Krainer, *Nat Struct Biol*, 2003), soit mimer une séquence ESE activatrice de l'inclusion avec une extension non complémentaire au niveau de l'exon 7 (Skordis et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003) ou soit, encore, masquer un motif intronique impliqué dans l'excision de l'exon 7 (Singh et coll., *RNA Biol*, 2009). Ces méthodes déclenchent *in vitro* une augmentation accrue de la protéine complète SMN et du nombre de gems dans des fibroblastes de patients atteints de SMA. Cependant, l'administration de ces oligonucléotides dans les motoneurones de patients atteints de SMA reste un défi et fait obstacle aux essais cliniques.

1.7.2.3. Autres substances

L'aclarubicine est un antibiotique de la famille des anthracyclines. Il a été démontré *in vitro* que cette substance pouvait modifier l'inclusion de l'exon 7 sur des minigènes *SMN2* introduits dans des motoneurones NSC34, ainsi que dans des fibroblastes issus de patients atteints de SMA de type I (Andreassi et coll., *Hum Mol Genet*, 2001). Bien qu'utilisé dans le cadre de leucémie ou contre des tumeurs solides lors de chimiothérapies, l'aclarubicine a des effets toxiques et n'est pas encore utilisé pour des traitements à long terme.

De même, il a été constaté que le sodium vanadate, un inhibiteur de phosphatase, était capable de stimuler considérablement l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN2 dans des cultures de fibroblastes provenant de patients atteints de SMA de type I (Zhang et coll., *Gene Ther*, 2001).

Enfin, le PTK-SMA1 est un nouveau composé généré par modification de la tétracycline (Nelson et coll., *J Org Chem*, 2003). Ce composé promeut l'inclusion de l'exon 7 *in vitro*, dans des fibroblastes issus de patients atteints de SMA de type I et *in vivo*, chez des souris mimant la SMA de type III (Hastings et coll., *Sci Transl Med*, 2009).

1.7.3. Traduction et stabilisation de la protéine SMN

L'augmentation de la traduction et stabilisation de la protéine SMN est une autre stratégie en voie de développement.

L'indoprofène est un inhibiteur de la cyclo-oxygénase, utilisé comme anti-inflammatoire non stéroïdien. Son action est mal définie mais permet d'augmenter l'efficacité de la traduction des ARNm. Il permet de multiplier par 5 la quantité de protéines SMN issues du gène *SMN2* dans des fibroblastes issus de patients atteints de SMA. De plus, son injection chez des femelles gestantes augmente la viabilité des embryons mimant la SMA (Lunn et coll., *Chem Biol*, 2004).

Les aminoglycosides permettent de forcer la lecture de l'ARNm au-delà des codons stop lors de leur traduction. Utilisés sur des fibroblastes issus de patients atteints de SMA ceux-ci permettraient de traduire l'ARNm issu du gène *SMN2* au-delà du codon stop de l'exon 8. De ce fait, la protéine SMN Δ 7 aurait une extension de la région C-terminale, ce qui augmenterait sa stabilité (Wolstencroft et coll., *Hum Mol Genet*, 2005). Cependant, les aminoglycosides n'ont qu'une faible capacité de pénétration du système nerveux central, ce qui rend leur utilisation *in vivo* particulièrement difficile.

1.7.4. Thérapies géniques et cellulaires

La thérapie génique est peut-être l'approche la plus directe pour traiter la SMA. Elle consiste en la correction du gène *SMN1* manquant, la cause fondamentale de la maladie. Ces travaux sont en plein essor. En 2003, le gène *SMN1* a été introduit *in vitro* dans des fibroblastes issus de patients atteints de SMA via un vecteur adénoviral. Les chercheurs ont observé une expression de la protéine SMN comparable à celle observée chez les sujets sains et la relocalisation de la gémme 2 au niveau des gems (DiDonato et coll., *Hum Gene Ther*, 2003). En 2004, l'injection du gène *SMN1* par un système de lentivirus dans les muscles d'un modèle de souris mimant la SMA n'a déclenché qu'une faible augmentation de la durée de vie (Azzouz et coll., *J Clin Invest*, 2004).

En 2010, le sauvetage d'un modèle murin mimant la SMA sévère en utilisant un vecteur viral adéno-associé auto-complémentaire, le sérotype 9 (scAAV9), est devenue une première étape historique (Foust et coll., *Nat Biotechnol*, 2010). Dans cette étude, les souriceaux ont été traités le premier jour postnatal avec une unique injection intraveineuse de 5×10^{11} virus adéno-associé porteur du gène *SMN1*. Il a été constaté par la suite que *SMN1* s'exprimait dans 60% des motoneurons de la moelle épinière, que la fonction motrice, la force et la physiologie musculaire étaient restaurées. Les souris traitées atteignent une durée de vie d'environ 400 jours, comparativement à 16 jours pour les animaux non traités. De plus, le scAAV9 diminue la bradycardie, ainsi que la dilatation associée à une baisse de contractilité du cœur, chez ces souris (Bevan et coll., *Hum Mol Genet*, 2010). D'autres groupes ont reproduit cette approche en utilisant à la fois les sérotypes 8 et 9. Ces deux virus adéno-associés ont été construits pour apporter *SMN1* aux

motoneurones (Passini et coll., *J Clin Invest*, 2010; Valori et coll., *Sci Transl Med*, 2010; Dominguez et coll., *Hum Mol Genet*, 2011; Glascock et coll., *Hum Gene Ther*, 2011). Cependant, les injections faites chez les souris ont leur effet maximal lorsque qu'elles sont réalisées le premier jour après la naissance. L'effet diminue rapidement avec l'âge ; les injections réalisées le cinquième jour n'ont qu'un effet partiel et celles réalisées le dixième n'ont aucun effet. Ceci implique que les thérapies géniques visant à augmenter l'expression de *SMN* chez les humains devront être coordonnées avec un dépistage clinique précoce. Ces observations suggèrent également qu'il y a une période critique dans le développement au cours de laquelle la quantité de protéine *SMN* détermine la santé à venir des motoneurones. D'autres questions sont soulevées par ce traitement : les projections tendent à dire qu'il faudrait 10^{14} particules virales pour traiter un enfant, pourra-t-on les générer ? ; Y aura-t-il une réaction immune dirigée contre la capsid de l'adénovirus associé qui neutralisera son impact ? (MacKenzie, *Nat Biotechnol*, 2010).

La thérapie cellulaire permettrait le remplacement des cellules défectueuses dans le cadre de la SMA. Ceci pourrait être obtenu par la transplantation de cellules souches qui ont subi une maturation *in vitro* ou par l'activation des cellules souches endogènes du système nerveux central. Les greffes de moelle osseuse et la transplantation de cellules mésenchymateuses sont les seules thérapies cellulaires actuellement en usage. Des progrès significatifs ont été obtenus chez des souris mimant la SMA suite à une transplantation de cellules souches neurales primaires dérivées de la moelle épinière ou une transplantation de cellules souches embryonnaires dérivées de précurseurs neuronaux (Corti et coll., *J Clin Invest*, 2008; Corti et coll., *Brain*, 2010).

1.7.5. Neuroprotection

La cardiotrophine 1 (CT-1) est un facteur neurotrophique de la famille des cytokines IL-6 (Pennica et coll., *Neuron*, 1996). L'injection intramusculaire d'un vecteur adéno-viral contenant la CT-1 permet une diminution de la mort motoneuronale et une augmentation de la durée de vie dans des souris mimant la SMA. En effet, la CT-1 déclenche la synthèse de la protéine *SMN* au niveau des motoneurones innervant les muscles injectés et induit leur protection. De plus, elle prévient la perte des axones moteurs proximaux et la désorganisation du cytosquelette des terminaisons synaptiques motrices (Lesbordes et coll., *Hum Mol Genet*, 2003).

Le riluzole bloque des canaux sodiques voltage dépendant. Ce médicament, utilisé comme traitement de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), limite la libération présynaptique du glutamate et protège les motoneurones de la mort par excitotoxicité. Cette molécule déclenche une neuroprotection chez un modèle murin de SMA mais peu d'allongement de la durée de vie (Haddad et coll., *Muscle Nerve*, 2003). Il semble que son administration soit bénéfique chez des patients atteints de SMA de type I (Russman et coll., *Arch Neurol*, 2003).

Des traitements par la gabapentine, un anticonvulsif potentiellement neuroprotecteur, ont été testés sur des patients atteints de SMA. Cependant aucun effet bénéfique jusqu'à présent n'a pu être observé, à l'opposé des études précliniques initiales (Taylor, *Rev Neurol (Paris)*, 1997; Miller et coll., *J Neurol Sci*, 2001; Merlini et coll., *J Child Neurol*, 2003).

Plusieurs rapports de cas individuels ont signalé que la thyroestimuline pouvait avoir d'éventuels effets neurotrophiques bénéfiques sur les cellules de la corne antérieure (Takeuchi et coll., *J Child Neurol*, 1994; Kato et coll., *J Child Neurol*, 2009). Des améliorations significatives de la force musculaire ont été observées lors d'une étude pilote sur 6 patients atteints de SMA traités pendant 5 semaines (Tzeng et coll., *Am J Phys Med Rehabil*, 2000).

Le ceftriaxone, un antibiotique de type β -lactame, est connu pour prévenir la perte des motoneurones (Rothstein et coll., *Nature*, 2005). Récemment son action a été testée sur un modèle murin mimant la SMA à raison de 200 mg/kg/jour. Il s'avère que celui-ci augmente la durée de vie des animaux (+33%) et améliore le phénotype neuromusculaire (Nizzardo et coll., *Exp Neurol*, 2011).

1.7.6. Autres stratégies

Il a été démontré dans la moelle épinière de souris mimant la SMA de type II, que la déplétion de SMN conduit à une augmentation de l'activation de RhoA, un des régulateurs majeurs du cycle dynamique de l'actine. En traitant ces souris avec le Y-27632 (30 mg/kg) ou du Fasudil, des inhibiteurs de ROCK (effecteur direct de RhoA) leur durée de vie est largement augmentée. Ce phénomène, indépendant de l'expression de SMN, est accompagné d'une augmentation de la maturation des jonctions neuromusculaires et de la taille des fibres musculaires (Bowerman et coll., *Hum Mol Genet*, 2010; Bowerman et coll., *BMC Med*, 2012).

L'albutérol (Salbutamol®) et d'autres bêta-agonistes ont attiré l'attention pour leur utilisation dans les maladies neuromusculaires. En effet, ils ont une faible toxicité et occasionnent une augmentation de la masse et de la force musculaire chez des volontaires sains (van Baak et coll., *Med Sci Sports Exerc*, 2000) et dans le modèle de souris mdx de la dystrophie musculaire de Duchenne (Harcourt et coll., *Neuromuscul Disord*, 2007). Une première étude de 6 mois sur 13 patients atteints de SMA de type II et III a montré de modestes bénéfices en force, fonction pulmonaire et masse maigre (Kinali et coll., *Neurology*, 2002). Dans une autre, plus récente, les 23 enfants atteints de SMA de type II (âgés de 30 mois à 6 ans) traités à l'albutérol ont montré une nette amélioration de leur score sur l'échelle de Hammersmith (Iwashita et coll., *Masui*, 2008).

1.8. Modèles animaux

La protéine SMN joue un rôle crucial dans la survie cellulaire. Cette implication a été démontrée par invalidation des gènes orthologues à SMN chez *Schizosaccharomyces Pombe* (levure à fission), *Caenorhabditis Elegans* (Ver Nématode), *Drosophila Melanogaster* (Drosophile, mouche du vinaigre), *Danio rerio* (poisson-zèbre), *Mus Musculus* (souris commune) et *Sus scrofa domesticus* (cochon domestique) (Miguel-Aliaga et coll., *Hum Mol Genet*, 1999; Frugier et coll., *Hum Mol Genet*, 2000; Hsieh-Li et coll., *Nat Genet*, 2000; Miguel-Aliaga et coll., *FEBS Lett*, 2000; Monani et coll., *Hum Mol Genet*, 2000; Owen et coll., *Hum Mol Genet*, 2000; Lorson et coll., *Transgenic Res*, 2011).

1.8.1. Modèles souris

L'homologue murin du gène *SMN* se trouve sur le chromosome 13. Des transcrits codant pour la protéine SMN sont produits dès le 7^e jour embryonnaire. Cependant, ceux-ci ne subissent jamais d'épissage alternatif. La séquence de ces ARN est relativement semblable à celle décryptée chez l'humain (Fig. 20). Ainsi, entre 82 et 83% des acides aminés de la protéine SMN attendue sont communs et sa localisation est conservée (DiDonato et coll., *Genome Res*, 1997; Schrank et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997).

hu	MAMssgGSGGGVPEQEDSVLFRRGTGQSDSDIWDOTALIKAYDKAVASFHKALNGDIC	60
mo	MAM--GSGGAGSEQEDTVLFRRGTGQSDSDIWDOTALIKAYDKAVASFHKALNGDIC	57
hu	ETSGPKPTTPKRPAKKNKSQKKNTAASLQWKVGDKCSAIVSEDCIYPATIASIDFKR	120
mo	ETPDKPKGTARRKPAKKNKSQKKNTATPLKQWKVGDKCSAVWSEDCIYPATITSIDFKR	117
hu	ETCVVYVTGYGNREEQNLSDLLSPICEVANNIEQNAQENenESQVSTDSENSRSPGNKS	180
mo	ETCVVYVTGYGNREEQNLSDLLSPTCEVANSTEQNTQEN--ESQVSTDSEHSSRSLRSK	175
hu	DNIKPKSAPWNSFLPPPPMPGPRLGPGKPGKLFNGPPPPPPPPPHLSCWLPPEPSGP	240
mo	AHSKSAAPWNSFLPPPPMPGSGLGPGKPGKLFNGPPPPPPPPPLPPPFPCWMPPEPSGP	235
hu	PIIPPPPIPCPDSLDDADALGSMLISWYMSGYHTGYMGRQNKKEGRCSHSl _n	294
mo	PIIPPPPIISPDCLOD _T DALGSMLISWYMSGYHTGYMGRQNKKEGRCSHT _n	288

Figure 20 : séquence d'acides aminés des protéines SMN humaine (hu) et murine (mo). L'homologie est indiquée en surbrillance. La protéine semble hautement conservée (83% d'homologie). La plus grande région ininterrompue d'homologie se trouve à proximité de l'extrémité amino-terminale. Les zones riches en proline sont également conservées.

(Schrank et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997)

L'invalidation homozygote du gène *Smn* chez la souris induit une mort embryonnaire précoce. Initialement, les embryons portant la mutation homozygote (*Smn*^{-/-}) ne sont pas distinguables des embryons portant la mutation hétérozygote (*Smn*^{+/-}) ou non-muté (*Smn*^{+/+}). Puis, en seulement 80 heures, ces embryons montrent des signes de développement aberrant. Bien que la plupart des embryons *Smn*^{-/-} arrivent au stade morula, la forme sphérique générale est perdue et les embryons apparaissent ratatinés. Contrairement aux embryons contrôles, aucun embryon *Smn*^{-/-} ne forme de blastocœle. Ceci indique qu'il existe une source de protéine SMN d'origine maternelle qui est utilisée durant les premiers stades du développement embryonnaire. Par la suite, cette source s'épuise durant les premiers cycles de division et l'embryon fini par dégénérer (Fig. 21). En parallèle, il a été constaté que les souris *Smn*^{+/-}, ayant donc une réduction de 50% du dosage de *Smn*, se développent correctement et ne présentent pas de dégénérescence motoneuronale (Schrank et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997).

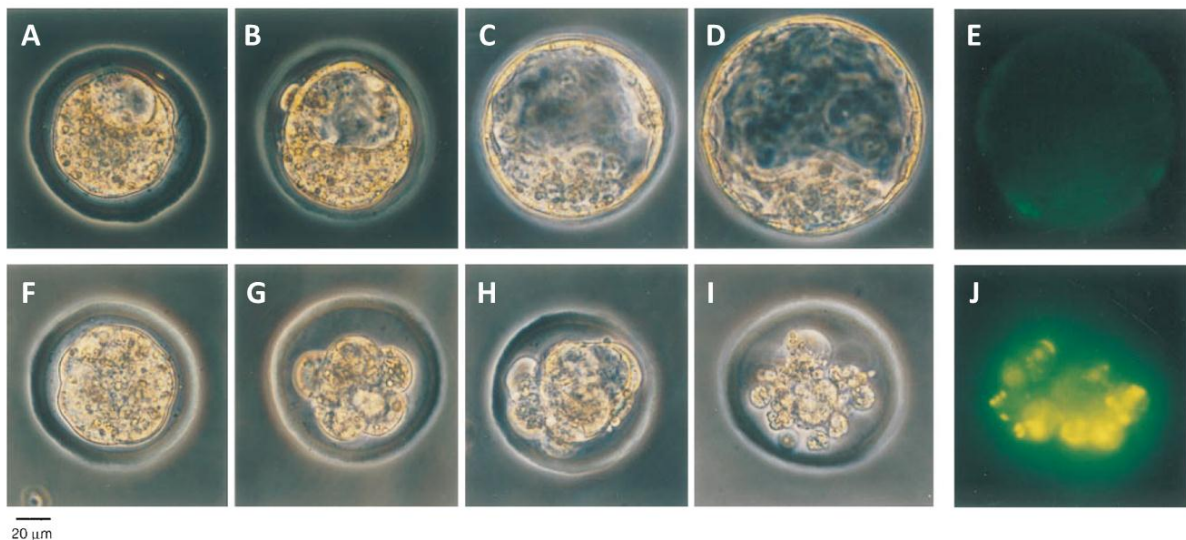


Figure 21 : morphologie et coloration TUNEL d'embryons contrôles et invalidés pour *Smn*. A-E, Embryons contrôles à différents temps. F-K, embryons invalidés pour *Smn* à des temps équivalents. La mutation homozygote du gène *Smn* entraîne une défaillance dans la transition blastuléenne (G et H) puis une vaste dégénérescence cellulaire (I). Les blastocystes contrôles montrent très peu de cellules marquées à la coloration TUNEL (E) à l'inverse des blastocystes mutants, ce qui suggère une mort cellulaire par apoptose (J).

(Schrank et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997)

Comme il n'y a pas de duplication du gène orthologue murin pouvant sauver partiellement les souris invalidées pour le gène *Smn*, il est devenu indispensable de construire des modèles transgéniques sophistiqués mimant la SMA.

1.8.1.1. Les Modèles de Burghes

Les souris dans ce modèle sont invalidées pour le gène *Smn* murin, par insertion d'un vecteur cible résistant à la néomycine en position 40 de l'exon 2. Aucune souris *Smn*^{-/-} ne peut dépasser les premiers stades embryonnaires. De ce fait, l'équipe d'Arthur Burghes a intégré le transgène humain *SMN2* entier, incluant son promoteur, sur un fragment *Bam*H1 de 35,5 kb dans le clone génomique PAC215P15 (Fig. 22) (Monani et coll., *Hum Mol Genet*, 1999). Puis, ce fragment a ensuite été excisé de PAC215P15 et microinjecté dans des ovocytes fécondés de souris *Smn*^{+/-}. Les souris *Smn*^{+/-} *SMN2* résultantes ont été croisées avec des souris *Smn*^{+/-} pour donner des souris *Smn*^{-/-} *SMN2* mimant la SMA. Une lignée présentant 1 à 2 copies du transgène *SMN2* et une autre avec 8 copies ont été développées.

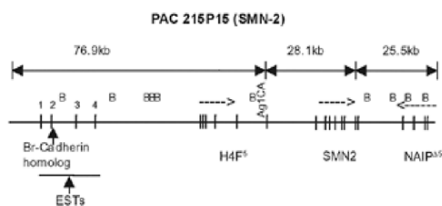


Figure 22 : représentation schématique du transgène *SMN2* se trouvant dans le clone génomique PAC215P15. Sont également représentés le gène *H4F5*, des portions du gène *NAIP* et des exons situés en 5' de *SMN2*. B, les sites *Bam*H1. Les flèches en pointillé indiquent le sens d'expression. Le fragment contenant *SMN2* a été excisé et microinjecté dans des ovocytes fertilisés de souris.

(Monani et coll., *Hum Mol Genet*, 2000)

Les souris *Smn*^{-/-} présentant 1 ou 2 copies du transgène *SMN2* miment la SMA de type I. Comparées aux souris contrôles du même âge, elles expriment entre 10 à 20 fois moins la protéine SMN dans leur système nerveux. De plus, presque aucun gem n'est présent dans leurs fibroblastes ou leurs cellules de la moelle épinière.



Figure 23 : souris mimant la SMA (*Smn*^{-/-} avec 1 ou 2 copies du transgène *SMN2*) reposant à côté d'une souris contrôle (*Smn*^{+/-} ou *Smn*^{+/+} avec 1 ou 2 copies du transgène *SMN2*) de la même portée à 4 jours. Ces souris mimant la SMA présentent une diminution des mouvements et une faiblesse musculaire.

La grande majorité de ces souris *Smn*^{-/-} *SMN2* (42/56) sont mortes-nées ou meurent dans les 6 heures suivant la naissance. Elles sont légèrement plus petites (poids moyen = 1,33 g) que les souris contrôles (poids moyen = 1,51 g). En outre, il a été démontré que les embryons de ces souris présentaient des défauts du système nerveux : morphologie altérée des nerfs crâniens et spinaux au stade E10,5 et mort cellulaire anormale dans le télencéphale au stade E14,5 (Liu et coll., *J Neurosci Res*, 2010).

(Monani et coll., *Hum Mol Genet*, 2000)

Dans certains cas (14/56) les souriceaux survivent entre 4 et 6 jours (Fig. 23). Ceux-ci ne sont pas distinguables des contrôles avant 48h, puis une rapide détérioration les conduit à la mort. En l'espace de 48h-72h, ils montrent une diminution de leurs mouvements, de leur prise de nourriture lors de l'allaitement, des difficultés respiratoires et des tremblements dans les membres. Une perte importante des motoneurones faciaux et spinaux a été constatée chez ces souris (Monani et coll., *Hum Mol Genet*, 2000) ainsi qu'une diminution du calibre et de la densité des capillaires dans les muscles (Somers et coll., *Neuromuscul Disord*, 2011).

Les souris *Smn*^{-/-} *SMN2* venant de la lignée avec 8 copies du transgène, ne présentent pas un phénotype marqué ; si ce n'est une queue plus courte à partir de 2 semaines. Celles-ci ne présentent pas de pertes significatives des motoneurones faciaux ou spinaux par rapport aux souris contrôles du même âge. Par conséquent, les transgènes humains *SMN2* sont capables de corriger l'invalidation totale du gène *Smn* murin et un nombre élevé de copies du transgène réduit grandement la sévérité du phénotype.

Par la suite, les souris $Smn^{+/-}$ SMN2 ont été croisées avec des souris présentant de 2 à 17 copies du gène SMNΔ7, placées sous la dépendance d'un promoteur de *Smn* de 3,4kb (Le et coll., *Hum Mol Genet*, 2005). Cet autre modèle a permis de mettre en évidence que la protéine tronquée SMNΔ7 modulait également la sévérité de la maladie. En effet, les souris $Smn^{-/-}$ SMN2 SMNΔ7 présentent une augmentation significative de la durée de vie et du poids par rapport aux souris $Smn^{-/-}$ SMN2. Ce constat est observé chez les porteurs d'une ou deux copies du transgène.

1.8.1.2. Modèle de Hung Li

Ce modèle est basé sur l'invalidation spécifique de l'exon 7 du gène *Smn* murin par intégration d'une cassette Hypoxanthine Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) (Fig. 24).

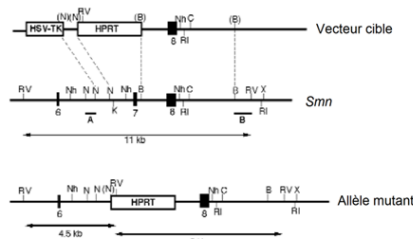
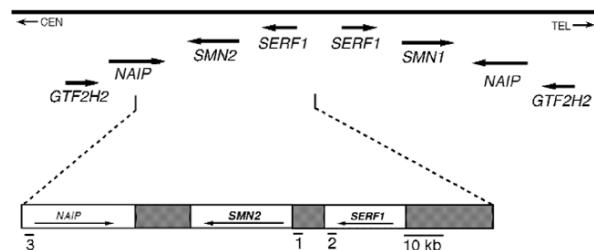


Figure 24 : invalidation ciblée du gène *Smn* murin. La structure génomique du locus ciblé et le vecteur cible sont représentés en haut. Les rectangles remplis correspondent aux exons. L'allèle mutant résultant est représenté en bas. Les sondes A et B ont été utilisées pour le génotypage des allèles de type sauvage ou mutant de cellules souches embryonnaires ou des cellules de queue de souris. N, *NdeI* ; RV, *EcoRV* ; B, *BamHI* ; Nh, *NheI* ; C, *ClaI* ; X, *XbaI* ; RI, *EcoRI*.

(Hsieh-Li et coll., *Nat Genet*, 2000)

Les souris $Smn^{+/-}$ obtenues apparaissent normales et aucune souris $Smn^{-/-}$ n'a pu être obtenue. En effet, les embryons $Smn^{-/-}$ dégénèrent entre les stades préimplantatoires E3,5 et E6,5. Afin d'élucider les rôles de SMN1 et SMN2, des souris transgéniques ont, par la suite, été générées par microinjection d'un fragment d'ADN génomique humain de 115 kb contenant la région complète du gène SMN2, une partie du gène centromérique *NAIP* et le gène centromérique intact *H4F5* (aussi appelé *SERF1*) (Fig. 25).

Figure 25 : organisation génique du transgène SMN2 humain. La région répétée inversée contient au moins quatre gènes dupliqués : *SMN*, *NAIP*, *GTF2H2* (p44) et *SERF1*. Le clone d'ADN BAC de 115-kb utilisé pour générer les souris transgéniques démarre de l'exon 10 de *NAIP* centromérique, 55 kb en amont de la région codante de *SMN2*. Trois paires d'amorces (1, 2 et 3) sont utilisées pour la détection par PCR du transgène.



(Hsieh-Li et coll., *Nat Genet*, 2000)

Les 5 lignées indépendantes de souris $Smn^{+/-}$ SMN2 générées ont été croisées avec des souris $Smn^{+/-}$. Dans toutes les portées résultant de ces croisements, des souris $Smn^{-/-}$ SMN2 ont été observées. Ce qui implique que les transgènes SMN2 humains peuvent compenser partiellement le déficit du gène *Smn* murin. En outre, il a été constaté que les transcrits provenant du transgène humain SMN2 subissaient un épissage alternatif, contrairement à ceux provenant du gène *Smn* endogène. Les souris $Smn^{+/-}$ SMN2 développent une perte progressive des motoneurones de large diamètre, ainsi que des changements musculaires pathologiques similaires à ceux présents chez les patients atteints de SMA. Le phénotype de ces souris mimant la SMA est corrélé au nombre de copies du transgène SMN2 humain intégrées. Ainsi, une seule copie de SMN2 favorise l'obtention de souris mimant la SMA de type I ; deux copies, de type II et trois copies ou plus, de type III (Fig. 26).

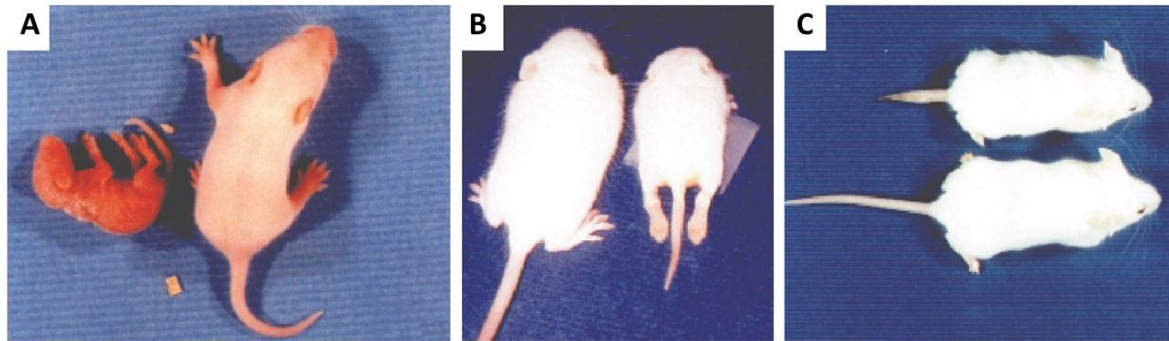


Figure 26 : phénotypes des souris mimant la SMA. A, souris mimant la SMA de type I (à gauche) et contrôle de la même portée (à droite). B, souris mimant la SMA de type II montrant une paralysie des membres postérieurs (à droite) et contrôle de la même portée (à gauche). C, souris mimant la SMA de type III présentant une queue courte et élargie (en haut) et contrôle de la même portée (en bas).

(Hsieh-Li et coll., *Nat Genet*, 2000)

Les souris mimant la SMA de type I meurent avant l'âge de 10 jours. Elles ne développent pas de pilosité et présente une atrophie générale très marquée.

Les souris mimant la SMA de type II ne montrent aucune différence avec les souris témoins jusqu'à l'âge de 5-6 jours. Puis celles-ci vont développer une atrophie musculaire progressive associée à une hypotonie sévère. Leur activité est faible et leurs symptômes sont variables. La durée de vie de ces souris est comprise approximativement entre 2 et 4 semaines. Par ailleurs, il a été démontré que ces souris étaient sujettes à une ostéoporose précoce dans les vertèbres lombaire, le tibia et le fémur (Shanmugarajan et coll., *J Pathol*, 2009). De même, une sévère dénervation des muscles de la tête, du cou, du tronc et des membres a été observée (Ling et coll., *Hum Mol Genet*, 2012).

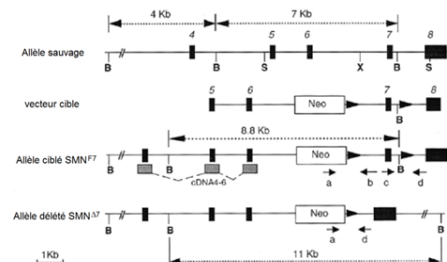
Les souris mimant la SMA de type III ont une durée de vie normale et peuvent se reproduire. Elles développent des nécroses chroniques de la queue, des oreilles et des pattes inférieures, ainsi qu'une cécité.

L'analyse histologique du foie, de la rate, des reins, des poumons et des intestins des souris mimant la SMA n'a révélé aucune anomalie. A l'inverse, les analyses des muscles de la queue, des membres et du tronc, ont révélé une diminution du diamètre des fibres musculaires et une atrophie des faisceaux musculaires. De plus des œdèmes sous-cutanés sont présents au niveau de la queue, conséquence de la perte des motoneurons spinaux qui conduisent à une atrophie musculaire puis un défaut du reflux sanguin dans les veines et donc une hypoxie locale chronique (Hsieh-Li et coll., *Nat Genet*, 2000).

1.8.1.3. Les stratégies Cre-loxP

Dans cette stratégie, l'exon 7 du gène *Smn* est encadré par deux séquences *loxP*. Les souris hétérozygotes et homozygotes pour cette insertion ne présentent aucune différence par rapport aux souris contrôles. Par la suite on réalise une délétion localisée de l'exon 7 via Cre sous la dépendance d'un promoteur spécifique (Fig. 27).

Figure 27 : mutagenèse conditionnelle de l'exon 7 de *Smn* murin. Le locus génomique sauvage *SMN* entourant l'exon cible est représenté en haut, le vecteur de ciblage, l'exon 7 de *SMN* flanqué de séquence *loxP* et en dessous, l'allèle délété. Les rectangles remplis correspondent aux exons et les flèches indiquent la position des séquences *loxP*. Les sondes a, b, c et d sont utilisées pour la détection des allèles mutés. B, *Bam*H1 ; X, *Xho*1 ; S, *Sa*I1; Neo, cassette résistante à la néomycine. Sondes : a, *PHR5* ; b, *XG3* ; c, *ex7sou1* et d, *GS8*.



(Frugier et coll., *Hum Mol Genet*, 2000)

Les souris hétérozygotes pour l'inclusion de *loxP*, *Smn*^{F7} (*Smn* flanking exon7) sont croisées avec une souche de souris possédant un transgène pour la recombinase Cre, sous le promoteur ubiquitaire du cytomégalo virus (Dupe et coll., *Development*, 1997). Les souris résultant de ce croisement, expriment à 50% la protéine SMN complète et à 50% la protéine SMN Δ 7. Ces souris hétérozygotes, *Smn*^{+/ Δ 7}, ne montrent aucune modification par rapport aux souris contrôles, contrairement aux souris homozygotes, *Smn* ^{Δ 7/ Δ 7}, qui meurent à E9 (Frugier et coll., *Hum Mol Genet*, 2000).

Une délétion spécifique de l'exon 7 dans les neurones a été réalisée en utilisant le même système de recombinaison d'ADN Cre/*loxP*. Dans ce cas, le promoteur de l'énolase spécifique des neurones (ou NSE pour Neuron Specific Enolase) est utilisé pour activer l'expression de la recombinase Cre (Forss-Petter et coll., *Neuron*, 1990). Les souris *Smn*^{F7/ Δ 7}, *NSE-CRE*⁺ ont une durée de vie moyenne de 25 jours (entre 17 et 36 jours, n=10). Elles présentent des tremblements et un déficit moteur important qui conduira à la paralysie totale de l'animal (Fig. 28). De plus, les sections transverses de muscles squelettiques (gastrocnémien, intercostaux, sternomastoidiens) ont révélé la présence de groupes de fibres musculaires atrophiées.

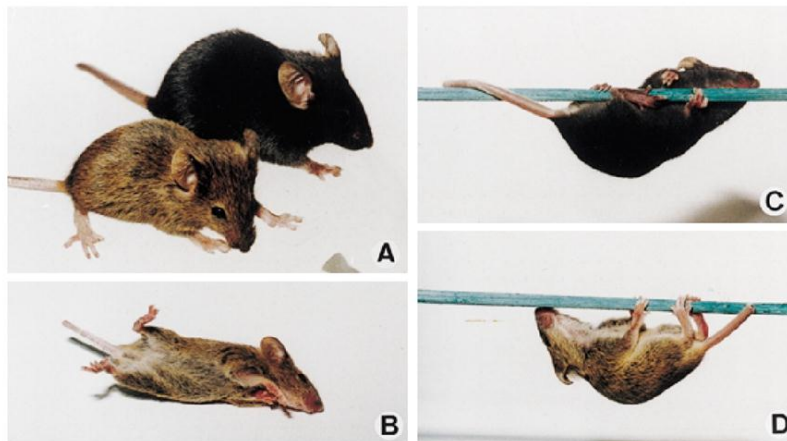


Figure 28 : défauts moteurs chez les souris *SMN*^{F7/ Δ 7}, *Cre*⁺. A, posture anormale des pattes chez les souris *SMN*^{F7/ Δ 7}, *Cre*⁺ âgées de 3 semaines (agouti) comparé aux souris contrôles (noire). B, les souris mutantes ont des difficultés à se replacer sur les pattes après avoir été placées sur le dos. C et D, les souris mutantes présentent une sévère hypotonie caractérisée par un défaut des muscles fléchisseurs des membres et du cou lorsqu'elles sont suspendues à l'horizontal (D) comparées au souris contrôles (C).

(Frugier et coll., *Hum Mol Genet*, 2000)

Il a été démontré que ces souris ont une perte importante et progressive des axones moteurs (+ de 73%). Cependant cette dénervation marquée n'est pas associée à une mort importante des motoneurones. En effet, seule la perte des gems, des déformations du noyau et une diminution du corps cellulaire (-29%) sont observées à 2 semaines. Par ailleurs, une accumulation massive de neurofilaments dans les terminaisons nerveuses des jonctions neuromusculaires (JNM) a été observée (Cifuentes-Diaz et coll., *Hum Mol Genet*, 2002).

De même, une délétion spécifique de l'exon 7 dans les muscles a été réalisée en utilisant ce système Cre/*loxP* (Cifuentes-Diaz et coll., *J Cell Biol*, 2001). Dans ce cas, le transgène de la recombinase Cre est sous le contrôle du promoteur du gène de l' α -actine humaine (HSA) (Miniou et coll., *Nucleic Acids Res*, 1999). Bien que la réduction drastique de SMN soit détectable à 15 jours chez les souris *Smn*^{F7/ Δ 7}, *HSA-CRE*⁺, les premiers symptômes se déclarent à l'âge de 3 semaines. Ces souris mutantes, mâles ou femelles, ont une durée de vie moyenne de 33 jours (entre 28 et 37 jours, n=18). Elles souffrent d'une myopathie progressive conduisant à la paralysie et d'une cyphose marquée (Fig. 29). L'analyse des muscles a révélé des fibres nécrotiques et une déstabilisation du sarcolemme. En effet, on constate une diminution des dystrophines, une augmentation des utrophines et des niveaux 6 fois plus élevés d'activité pour la créatine kinase. Néanmoins, aucune modification des JNMs ou de la moelle épinière n'a été détectée.

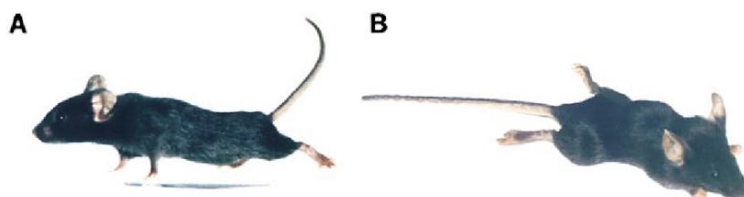


Figure 29 : défaut moteur et morphologie des muscles squelettiques chez les souris contrôle et *SMN^{F7/Δ7}, HSA-Cre*. A et B, les souris mutantes présentent à 4 semaines une paralysie, une posture anormale des membres et une cyphose (B) comparées aux souris contrôles (A).

(Cifuentes-Diaz et coll., *J Cell Biol*, 2001)

Par ailleurs, lorsque les myotubes perdent totalement l'expression de la protéine SMN complète et que les cellules satellites restent intactes, on observe une augmentation remarquable de la survie (jusqu'à 8 mois) et des performances motrices des souris mutantes (Nicole et coll., *J Cell Biol*, 2003).

Au final, l'invalidation de SMN dans n'importe quel type cellulaire a des répercussions sur la survie comme cela a été démontré dans des souris où la protéine SMN était sélectivement délétée dans le foie (Vitte et coll., *Am J Pathol*, 2004). Dans ce cas, le transgène de la recombinaise Cre était sous le contrôle du promoteur du gène de l' α -foetoprotéine. Les souris *Smn^{F7/Δ7}, Alfp-CRE⁺* présentent un retard de développement du foie et décèdent à E18. Cela renforce l'idée que différents organes sont touchés dans les formes sévères de SMA et que les approches thérapeutiques doivent cibler plusieurs tissus.

1.8.2. Autres modèles animaux

Les levures sont considérées comme le modèle de base pour l'étude génétique dans des cellules eucaryotes. *Schizosaccharomyces Pombe* possède un gène orthologue à SMN. La protéine résultant Yab8, ou ySMN, possède une grande homologie avec SMN humain aux parties amino- et carboxy-terminales. Elle est localisée dans le noyau et le cytoplasme et sa présence est indispensable pour la viabilité de la levure (Paushkin et coll., *J Biol Chem*, 2000).

Le destin de chaque cellule est connu chez le ver nématode. *Caenorhabditis Elegans* possède également un gène orthologue à SMN appelé C41g7.1, ou CeSMN (Talbot et coll., *Hum Mol Genet*, 1997). Celui-ci contient 4 petits introns et 5 exons qui codent un transcrit de 745 nucléotides pour une protéine de 207 acides aminés. La protéine contient un domaine TUDOR, est localisée dans le noyau et le cytoplasme et s'exprime fortement dans le tissu nerveux (Miguel-Aliaga et coll., *Hum Mol Genet*, 1999). La réduction de CeSMN par des ARN interférents ou la délétion du gène réduit significativement le nombre d'embryons viables dans la progéniture. Les vers survivants ont une durée de vie plus courte et sont stériles. De plus, leur locomotion est perturbée à cause de défauts neuronaux et un faible tonus musculaire (Culetto et Sattelle, *Hum Mol Genet*, 2000; Briesse et coll., *Hum Mol Genet*, 2009).

Chez *Drosophila Melanogaster*, le gène orthologue à SMN se situe en position 73A9. Celui-ci contient 1 exon qui code un transcrit de 828 nucléotides pour une protéine de 226 acides aminés. Elle est exprimée dans les tissus nerveux et musculaires. L'interruption de l'expression de SMN dans des lignées mutantes déclenche des défauts de développement et la mort larvaire (Miguel-Aliaga et coll., *FEBS Lett*, 2000; Chan et coll., *Hum Mol Genet*, 2003).

Le poisson-zèbre est un excellent organisme pour l'étude des maladies humaines ; il constitue le pont entre les génétiques de type ver/drosophile et celles de type souris/humain (Dodd et coll., *Hum Mol Genet*, 2000). Son développement embryonnaire est bien caractérisé et il est possible de moduler les expressions géniques (Grunwald et Eisen, *Nat Rev Genet*, 2002). La réduction des niveaux de SMN (-75%) avec des oligomorpholinos antisens dans tout l'embryon, déclenche des défauts dans les axones des motoneurones. En

effet, leur croissance ainsi que leur guidage vers le muscle est perturbé, ce qui induit, par la suite, une perte des motoneurones. Les JNMs sont également affectées mais pas le développement du muscle. Les effets de ces oligomorpholinos antisens peuvent être partiellement contrecarrés par une injection d'ARNm de SMN humain (McWhorter et coll., *J Cell Biol*, 2003; Boon et coll., *Hum Mol Genet*, 2009).

Récemment, il a été démontré que la protéine SMN porcine se comportait comme la protéine SMN humaine. Ainsi, son introduction dans des fibroblastes de patient atteint de SMA de type I, restaure totalement la formation des gems et l'assemblage des snRNP (Lorson et coll., *Dev Dyn*, 2008). Un modèle porcin a été développé (Lorson et coll., *Transgenic Res*, 2011). Cet animal mime plus étroitement la maladie humaine par sa taille, sa physiologie, son métabolisme, son débit cardiaque, sa capacité pulmonaire et son système immunitaire. De plus, des traitements sur des périodes prolongées peuvent être réalisés et les fenêtres d'administration mieux appréhendées.

2. Amyotrophie spinale et exercice physique

L'ensemble des traitements qui se sont montrés efficaces sur les modèles animaux et actuellement testés, engendrent peu d'effets bénéfiques chez les patients atteints de SMA. Il a été démontré que cette maladie génétique se déclarait durant la phase où l'activité assure, en partie, la maturation de l'unité motrice et la survie des motoneurones (Geisler et coll., *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 1993; Hori et Kanda, *Neurosci Lett*, 1996; Jamon et Clarac, *Behav Neurosci*, 1998; Wolpaw et Tennissen, *Annu Rev Neurosci*, 2001; Favero et coll., *J Neurosci Res*, 2007). En effet, la SMA est désormais considérée comme une maladie du développement. Les analyses effectuées chez les patients ont révélé que leurs motoneurones, à la fois au niveau du corps cellulaire et de l'axone, étaient immatures et que leur excitabilité était modifiée (Buchthal et Olsen, *Brain*, 1970; Navarrete et Vrbova, *J Physiol*, 1984; Hausmanowa-Petrusewicz et Karwanska, *Muscle Nerve*, 1986; Krajewska et Hausmanowa-Petrusewicz, *Folia Neuropathol*, 2002). De plus, la présence anormale de desmine et de vimentine dans les muscles de patients atteints de SMA, suggère un dysfonctionnement de la myogenèse (Fidzianska et coll., *Brain*, 1990). De ce fait les thérapies basées uniquement sur la correction des déficits induits par le manque de SMN soit dans les motoneurones, soit dans les muscles (Cisterni et coll., *Neurobiol Dis*, 2001; Guettier-Sigrist et coll., *Fundam Clin Pharmacol*, 2001; Simic et coll., *Acta Neuropathol*, 2008) ne peuvent être efficaces. L'unité motrice doit être abordée dans son ensemble dans le cadre de traitement contre la SMA.

2.1. Bienfaits de l'exercice physique

L'exercice a été défini comme une forme d'activité physique sportive ou de loisir, structurée et pratiquée de façon répétitive sur une période de temps donnée. Il a pour but précis d'améliorer une performance ou une composante de sa condition physique (Kino-Québec, 1999). Il se traduit par des mouvements corporels produits par contraction des muscles squelettiques ; ce qui entraîne une augmentation de la dépense énergétique. L'exercice physique est caractérisé selon plusieurs paramètres : son type (assouplissement, endurance ou résistance) sa durée, sa fréquence, son intensité et son contexte.

De nos jours, il est admis que l'exercice physique joue sur la santé et la plasticité du système nerveux. Par exemple, il a été démontré que l'exercice physique augmentait la neurogenèse dans l'hippocampe chez l'adulte (van Praag et coll., *Nat Neurosci*, 1999), améliore les capacités cognitives chez la personne âgée (Kramer et coll., *Brain Res Bull*, 2000; Kramer et Erickson, *Trends Cogn Sci*, 2007) et limite les processus neurodégénératifs (Larsen et coll., *J Comp Neurol*, 2000).

De plus, l'exercice physique peut avoir des vertus thérapeutiques. Suite à un trauma, l'activité physique répétée améliore les capacités locomotrices chez l'animal (Burgess et Villablanca, *Behav Brain Res*, 1986; Barbeau et Rossignol, *Brain Res*, 1987; Edgerton et coll., *J Am Paraplegia Soc*, 1991; Stummer et coll., *Stroke*, 1995; Klintsova et coll., *Brain Res*, 1998) et chez les êtres humains (Perry, *J Neurosurg*, 1983; Wernig et coll., *Eur J Neurosci*, 1995; Harkema et coll., *J Neurophysiol*, 1997). Il a été démontré, dans différents modèles animaux, que l'exercice physique limitait la progression des maladies neuromusculaires, comme la neuropathie motrice progressive (Ferrer-Alcon et coll., *Neuroscience*, 2008) et de nombreuses maladies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson (Fisher et coll., *J Neurosci Res*, 2004), la maladie d'Alzheimer (Adlard et coll., *J Neurosci*, 2005), la maladie de Huntington (Pang et coll., *Neuroscience*, 2006). Cependant, différents protocoles d'exercice peuvent induire des effets différents, voire opposés. Dans le cadre de la sclérose latérale amyotrophique (SLA), il a été démontré qu'un exercice de faible intensité était bénéfique pour les souris mimant la SLA (Kirkinezos et coll., *Ann Neurol*, 2003; Veldink et coll., *Neuromuscul Disord*, 2003; Kaspar et coll., *Ann Neurol*, 2005; McCrate et

Kaspar, *Neuromolecular Med*, 2008; Deforges et coll., *J Physiol*, 2009), mais un exercice à haute intensité promeut la mort des motoneurones (Mahoney et coll., *Muscle Nerve*, 2004).

En outre, Il a été démontré qu'un exercice de course quotidien, dans une roue à vitesse contrôlée, était bénéfique pour des souris mimant la SMA de type II (Grondard et coll., *J Neurosci*, 2005; Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008). En faisant courir ces souris 40m les 3 premiers jours, 60m le 4^e, 80m le 5^e et 100 m à partir du 6^e, les auteurs ont pu observer une nette augmentation de la durée de vie de 57,3%, de la prise de poids et de l'activité spontanée par rapport aux souris sédentaires (Grondard et coll., *J Neurosci*, 2005). De plus, l'exercice physique induit de nombreux changements bénéfiques sur les composants de l'unité motrice.

2.2. Unité motrice

L'unité motrice est composée d'un unique motoneurone α , son axone et l'ensemble des fibres musculaires qu'il innerve (Fig. 30). Ensemble ils constituent la plus petite unité contractile fonctionnelle activable par le système nerveux. Une fibre musculaire ne peut être innervée que par un seul motoneurone. Pour ce qui est de la musculature de la tête et du cou, les motoneurones α sont localisés dans les noyaux moteurs des nerfs crâniens du tronc cérébral. Pour ce qui est de la musculature du tronc et des membres, les motoneurones α sont localisés dans la corne antérieure de la moelle épinière. A noter, que les axones moteurs sont myélinisés. Ces neurones ont un diamètre supérieur à 200 μm pour leur corps cellulaire et entre 10 et 20 μm pour leur axone.

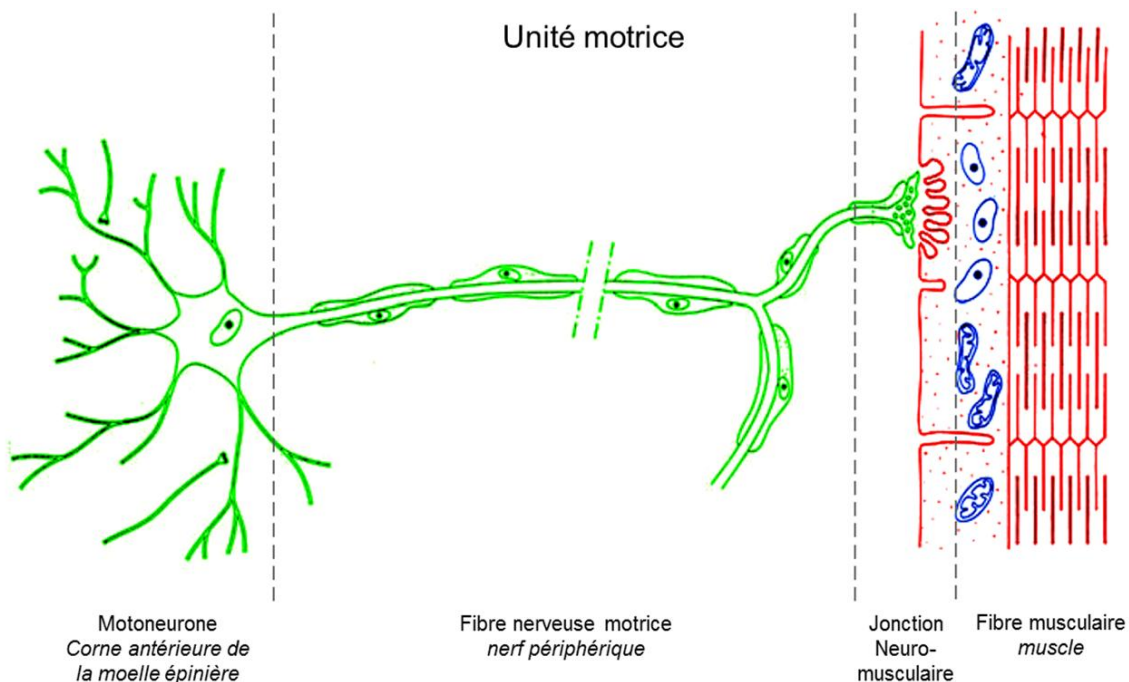


Figure 30 : représentation schématique des composants de l'unité motrice.

Plus le diamètre du corps cellulaire d'un motoneurone est grand, plus grand est le diamètre de son axone et plus il innerve de fibre musculaire. De plus, la taille des unités motrices est directement proportionnelle à la précision du mouvement effectué. Par exemple, un motoneurone innerve près de 2000 fibres musculaires dans le quadriceps, muscle puissant de la jambe ; à l'inverse, un motoneurone innerve 3 à 4 fibres dans les muscles oculomoteurs.

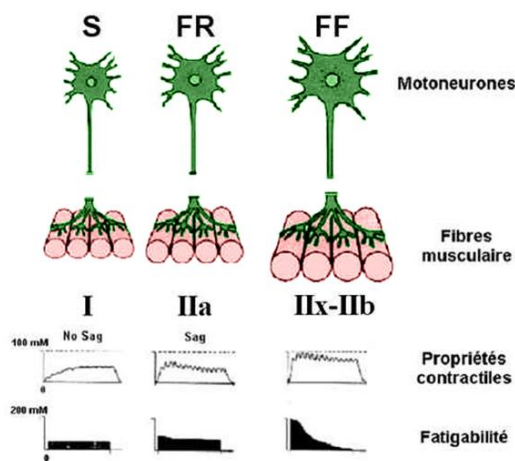


Figure 31 : différents types d'unités motrices.

Il existe trois types d'unités motrices en fonction de leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles (Fig. 31) :

- Les unités motrices rapides et fatigables (FF pour Fast Fatigable). Elles composent principalement des muscles responsables du mouvement. Elles permettent des contractions d'une grande intensité mais sur un temps très court (<2 min). Par conséquent, elles mettent en jeu d'une part, de larges motoneurones ($>600 \mu\text{m}^2$) ayant une vitesse de conduction du signal rapide ($105\text{-}120 \text{ m.s}^{-1}$) ; et d'autre part, de nombreuses fibres musculaires de type rapide (fibres de type IIB et IIX) ayant un large diamètre.
- Les unités motrices rapides et résistantes (FR pour Fast Resistant). Elles permettent les fortes contractions sur de longue durée (>6 min). Elles mettent en jeu des motoneurones de diamètre intermédiaire (entre 300 et $600 \mu\text{m}^2$) ayant une vitesse de conduction du signal allant de 90 à 105 m.s^{-1} et les fibres musculaires dites intermédiaires (fibres de type IIA)
- Les unités motrices lentes (S pour Slow). Elles composent les muscles responsables du maintien de la posture. Elles permettent des contractions de faible intensité sur une très longue durée (supérieure à 1h). Elles mettent en jeu des petits motoneurones ($<300 \mu\text{m}^2$) ayant une vitesse de conduction du signal lente ($70\text{-}90 \text{ m.s}^{-1}$) et des groupes peu nombreux de fibres musculaires lentes (fibre de type I).

2.2.1. Fibres musculaires

2.2.1.1. Structure et développement

Les muscles squelettiques sont caractérisés par un appareil contractile très dense : les myofibrilles. Celles-ci sont composées de protéines contractiles, telles l'actine et la myosine. La typologie musculaire est déterminée par la présence des isoformes des protéines contractiles, ayant des caractéristiques fonctionnelles et métaboliques différentes. Par exemple, l'expression majoritaire d'une isoforme de la chaîne lourde de la myosine (MyHC pour Myosin Heavy Chain) renseigne sur la typologie musculaire (Pette et Staron, *Int Rev Cytol*, 1997). Ainsi, les isoformes embryonnaire, néonatale et adultes de la MyHC vont s'exprimer de manière séquentielle au cours du développement (Schiaffino et coll., *J Muscle Res Cell Motil*, 1989). Les différents types de fibres musculaires ont donc été caractérisés en fonction de leurs composantes mécaniques et métaboliques :

- Les fibres musculaires très rapides sont appelées fibres de type IIB. Ces fibres ont un large diamètre, présentent peu de mitochondries et sont très peu irriguées. Elles sont composées d'une quantité importante de protéines contractiles en leur centre et produisent une contraction de forte intensité sur un temps très court.
- Il existe plusieurs fibres musculaires rapides. On distingue les fibres de type IIA, IIX ou IID. Toutes les trois sont faiblement irriguées. Les fibres de type IIA, dites intermédiaires, ont un diamètre inférieur aux fibres IIB, présentent un grand nombre de mitochondries et de protéines contractiles. Elles produisent une contraction d'assez forte intensité et sur un temps long. Les fibres de type IIX ou IID, quant à elles, ont un large diamètre, peu de mitochondries et un équipement myofibrillaire important. De ce fait, elles produisent une contraction plus importante que les fibres de type IIA mais sur un temps plus court.

- Enfin les fibres musculaires lentes sont appelées fibres de type I. Elles possèdent un petit diamètre, de très nombreuses mitochondries et sont irriguées par un réseau dense de capillaires. Elles réalisent des contractions de faible amplitude mais maintenues sur un temps relativement long.

La mise en place des muscles squelettiques chez les vertébrés débute durant les premiers stades de l'embryogénèse. Les myoblastes, des cellules embryonnaires provenant des somites, vont se multiplier et, sous l'influence de divers facteurs inducteurs, vont migrer jusqu'à leur zone de différenciation. Ils vont alors se différencier, fusionner et donner naissance à des myotubes plurinucléés. Ces fibres musculaires immatures vont progressivement exprimer des protéines contractiles et se spécialiser. Chez les mammifères cette étape se déroule en deux temps, appelés myogenèse primaire et myogenèse secondaire.

Au cours de la myogenèse primaire, une première vague de myotubes est constituée sous l'influence de facteurs de transcription spécifiques, tel Pax3 (paired box gene 3) combinés à des facteurs myogéniques de type MRF (Myogenic Regulating Factors). Ces myotubes sont à l'origine de des fibres I et quelques fibres de type II pour les muscles entièrement rapides (Stockdale et Miller, *Dev Biol*, 1987). Ces fibres ne représenteront qu'une infime part du muscle adulte *in fine*. A noter, que le processus d'innervation, indispensable au maintien de cette génération de myotubes, est concomitant.

La myogenèse secondaire est une étape de forte croissance musculaire. Les nombreux myoblastes présents autour des fibres primaires innervées vont fusionner. Ils donneront naissance au reste des fibres rapides pour les muscles rapides et les fibres lentes pour les muscles mixtes ou lents. Avant la naissance, toutes ces fibres musculaires seront innervées par plusieurs fibres nerveuses. Aucun autre nouveau myotube n'apparaîtra après ces deux vagues successives de myogenèse.

Durant la période postnatale, les fibres musculaires vont subir des modifications importantes. Ainsi, les fibres musculaires vont élargir leur diamètre par accumulation de protéines contractiles et d'organites essentiels au bon fonctionnement du myotube. De plus, les cellules satellites myogéniques quiescentes vont fusionner avec les fibres musculaires préexistantes. Ces deux phénomènes agrandissent le muscle par hypertrophie et lui permettent de s'adapter à l'accroissement total de l'organisme et d'augmenter la force de contraction du muscle (Zammit et coll., *J Histochem Cytochem*, 2006; O'Connor et coll., *J Cell Sci*, 2007). Par ailleurs, les cellules satellites interviendront dans la réparation des fibres musculaires suite à un traumatisme (Relaix et Marcelle, *Curr Opin Cell Biol*, 2009). En parallèle, les muscles vont acquérir leur typologie adulte. Les MyHC embryonnaires sont remplacées par des MyHC néonatales, tout en exprimant les MyHC de type I et II suivant la nature du muscle. Par la suite, le muscle va affiner sa typologie sous l'influence de l'innervation. Les MyHC néonatales sont remplacées par les diverses MyHC adultes suivant la fonction et la force du muscle (Gokhin et coll., *J Exp Biol*, 2008).

Avant d'atteindre le stade fibre musculaire, les noyaux en position centrale dans les myotubes vont migrer vers la périphérie sous le sarcolemme et la concentration en protéines contractiles va augmenter. L'association des précurseurs d'actine et de myosine va permettre l'élaboration des sarcomères, les unités contractiles de base des myofibrilles. En parallèle, se développent d'une part, le réticulum sarcoplasmique permettant le stockage et la libération de calcium ; et, d'autre part, les tubules T, des invaginations transverses du sarcolemme assurant la propagation homogène du potentiel d'action (Epstein et Fischman, *Science*, 1991). Les contractions se produiront en réponse aux stimuli nerveux. Ceux-ci provoqueront un changement de polarité des tubules T ce qui déclenchera la libération massive de calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique. Le calcium induira un changement de conformation des molécules contractiles ; ce qui aboutira aux

raccourcissements des sarcomères sur l'ensemble du muscle (Farah et Reinach, *FASEB J*, 1995).

2.2.1.2. Fibres musculaires et SMA

Il a été démontré dans différents modèles animaux que l'inactivation du gène *SMN* engendrait de graves changements sur les muscles (Cifuentes-Diaz et coll., *J Cell Biol*, 2001; Rajendra et coll., *J Cell Biol*, 2007; Lee et coll., *Dev Biol*, 2011). Ainsi, la délétion constitutive de l'exon 7 du gène *SMN*, uniquement dans le muscle d'un modèle murin, engendre une dystrophie sévère (Cifuentes-Diaz et coll., *J Cell Biol*, 2001). En outre la protéine *SMN* est co-localisée avec l' α -actine des disques Z sarcomérique dans les muscles squelettiques. Les défauts musculaires observés dans les souris mimant des SMA sévères sont liés, entre autres, à une mauvaise organisation de cette structure sarcomérique (Walker et coll., *Hum Mol Genet*, 2008). De plus, il a été constaté qu'un défaut du locus *SMN* induisait la mort des myoblastes dans un modèle murin de SMA (Nicole et coll., *J Cell Biol*, 2003) et que la déplétion de *SMN* empêchait la fusion correcte des myoblastes (Shafey et coll., *Exp Cell Res*, 2005).

En ce qui concerne la typologie musculaire, les souris mimant la SMA de type II présentent un changement significatif dans la répartition des fibres comparées aux souris contrôles du même âge (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008). En effet, les souris malades ont plus de fibres embryonnaires et moins de fibres néonatales dans leurs muscles à P9. Tandis que les contrôles gagnent plus de fibres néonatales à P12, les taux chez les souris malades ne varient pas. Cet écart dans la maturation musculaire est plus marqué dans les muscles fléchisseurs, comme le *soleus* et le *plantaris*, que dans les muscles extenseurs, comme le *tibialis* (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008).

Il a été observé, chez les patients atteints de SMA, que leurs muscles possédaient beaucoup moins d'unités motrices que ceux des sujets sains. En revanche, ces unités motrices sont environ 3 fois plus étendues chez les patients atteints de SMA (Galea et coll., *Muscle Nerve*, 2001). La dégénérescence des motoneurones, caractéristique de la SMA, et leur mauvais fonctionnement induit un arrêt de la maturation des fibres musculaires (Hausmanowa-Petrusewicz, *Rev Neurol (Paris)*, 1988). De ce fait, la structure des muscles des malades ressemble à celle des muscles immatures des fœtus. Les fibres ont un petit diamètre et contiennent une grande quantité d'ARN (Fidzianska et coll., *Brain*, 1990; Stevens et coll., *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2008). De plus, les cellules myogéniques des malades atteints de SMA sont pauvres en certains facteurs, comme les CANP (Calcium-Activated Neutral Protease) essentiels à la mise en place des contacts neuromusculaires (Fidzianska et coll., *Clin Neuropathol*, 1984; Vrbova et Fisher, *Eur J Neurosci*, 1989).

Enfin, il a été constaté *in vitro* que l'innervation se maintenait plus longtemps sur des cellules musculaires saines que sur des cellules musculaires provenant de patients affectés par la SMA. Ainsi, les motoneurones en culture avec ces cellules musculaires dégèrent. En revanche, les neurones sensitifs ne sont pas affectés (Braun et coll., *Lancet*, 1995; Guettier-Sigrist et coll., *Muscle Nerve*, 2002). L'ensemble de ces résultats aboutissent à la conclusion que les fibres musculaires privées de *SMN* sont immatures et ne permettent pas un contact optimal avec les motoneurones (Greensmith et Vrbova, *Brain Res Dev Brain Res*, 1991, *Brain Res Dev Brain Res*, 1992).

2.2.1.3. Modifications induites par l'exercice

La contraction des muscles squelettiques est la base de l'exercice physique. En fonction du type d'exercice, son intensité, sa durée, sa fréquence et de la réponse hormonale à l'effort, l'exercice physique peut modifier la typologie, le métabolisme et la structure des muscles sollicités. Une seule séance est suffisante pour induire des

changements significatifs dans l'expression des gènes musculaires (McKenzie et Goldfarb, *Med Sci Sports Exerc*, 2007).

Les effets de l'entraînement sur le muscle, décrits dans les modèles animaux, oppose la pratique des exercices physiques d'endurance à ceux de force et de vitesse, dits de résistance (Holzer et coll., *Rev Med Suisse*, 2006). Ainsi les exercices d'endurance, telle la course, induisent une transition vers un phénotype musculaire plus lent. Ce phénomène est concomitant avec une densification du réseau capillaire et une augmentation du nombre de mitochondrie dans les fibres musculaires. La consommation maximale d'oxygène est ainsi améliorée et les fibres musculaires sont plus résistantes à la fatigue. Lors des exercices de résistance, telle la nage, on assiste à une augmentation de la proportion de fibres musculaires rapides et une chute du nombre de mitochondries. De plus, la masse des fibres musculaires s'accroît, ainsi que leurs diamètres, via l'activation des cellules satellites. Cet effet hypertrophique est associé à une synthèse accrue de protéines myofibrillaires. Suite à un exercice physique, les muscles sollicités sécrètent transitoirement des myokines, comme le BDNF, des facteurs trophiques, comme le VEGF, le GDNF et l'IGF-1 et des molécules responsables de la néo-vascularisation et de la myogenèse (McCrate et Kaspar, *Neuromolecular Med*, 2008; Chin et coll., *Eur J Pharmacol*, 2009; Ferraiuolo et coll., *J Neurochem*, 2009; Arnold et coll., *Gerontology*, 2011).

Dans le cadre de la SMA, il a été constaté que les souris mimant la SMA de type II, soumises à un entraînement à la course quotidien, présentaient une augmentation de leur force musculaire (Grondard et coll., *J Neurosci*, 2005). En effet, il a été observé qu'à P12 les souris malades entraînées pouvaient maintenir leur poids pendant un test de grip pendant plus de 5 secondes. Tandis qu'au même âge, les souris malades sédentaires ne peuvent pas soutenir leur poids. Les auteurs ont aussi analysé le phénotype de deux muscles de la patte, directement sollicités par l'exercice de course, le *soleus*, un extenseur lent et le *plantaris*, un extenseur rapide. Les coupes histologiques des deux muscles ont révélé que l'exercice ne pouvait pas corriger l'aplasie chez les souris mimant la SMA de type II. En revanche, l'exercice est suffisant pour enrayer le phénomène d'atrophie musculaire dans les muscles sollicités (Grondard et coll., *J Neurosci*, 2005).

Il a été constaté, deuxièmement, que l'exercice de course modifiait la typologie musculaire de souris mimant la SMA de type II (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008). En effet, l'exercice corrige partiellement le retard de maturation en diminuant, chez ces souris malades, le nombre de fibres embryonnaires au profit de fibres néonatales dans les muscles sollicités. De plus, l'exercice modifie également la typologie des muscles adultes chez les souris mimant la SMA. Ainsi, les auteurs ont observé un retour à des valeurs proches de celles des souris contrôles pour les fibres de type IIA, IIX et IIB dans les muscles à contraction rapide sollicités. De même, le taux de fibres de type I par rapport aux fibres de type II augmente suite à l'exercice dans les muscles à contraction lente sollicités (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008), comme constaté chez un individu sain soumis à un entraînement d'endurance (Pette et Staron, *Int Rev Cytol*, 1997).

2.2.2. Jonctions neuromusculaires

2.2.2.1. Structure et développement

Les jonctions neuromusculaires (JNMs) commencent à se former à l'âge embryonnaire. Les axones moteurs se ramifient en de nombreuses terminaisons nerveuses et se connectent à différentes myotubes néoformés. Afin que la contraction du muscle soit homogène lors de la décharge du motoneurone, les JNMs sont distribuées sur l'ensemble des fibres musculaires. Cependant, l'efficacité de la transmission synaptique n'est pas immédiate du fait de l'immaturité des membranes pré et post-synaptiques.

La membrane post-synaptique va se différencier après le contact avec la terminaison nerveuse. Les noyaux au centre des fibres musculaires vont exprimer des gènes essentiellement synaptiques. De plus, les récepteurs à l'acétylcholine (AChR), qui sont exprimés de manière uniforme à la surface de la fibre musculaire, vont se retrouver ségrégés au niveau du contact synaptique. Ces récepteurs nicotiniques, d'environ 280 kDa, sont constitués de deux sous-unités $\alpha 1$, d'une sous-unité $\beta 1$, d'une sous-unité δ et d'une sous-unité embryonnaire γ , qui sera remplacée durant la maturation postnatale par une sous-unité ϵ . Dans un muscle mature, ces agrégats atteignent une densité de plus de 10 000 récepteurs par μm^2 et la densité pour le reste de la membrane plasmique est d'environ 10 récepteurs par μm^2 (Bevan et Steinbach, *J Physiol*, 1977). L'agrégation des AChR est contrôlée par des molécules de la lame basale et du cytosquelette. Par exemple, l'agrine, un protéoglycane à héparane sulfate synthétisée par le motoneurone, est transportée le long de l'axone, sécrétée au niveau de la synapse puis incorporée à la lame basale où elle va participer à la mise en place de la structure post-synaptique (Tsen et coll., *J Biol Chem*, 1995).

Bien que la terminaison nerveuse toute seule puisse sécréter des neurotransmetteurs en réponse à une stimulation électrique (Young et Poo, *Nature*, 1983), la membrane pré-synaptique va se différencier après le contact avec le muscle. Initialement, la terminaison nerveuse ressemble à un bulbe avec aucune zone définie et contenant peu de vésicules synaptiques. De ce fait, la quantité de neurotransmetteurs libérée est faible. Puis, lors de la maturation, la synapse va s'élargir. Le volume augmente, ainsi que le nombre de vésicules synaptiques. L'agrégation de ces dernières sous l'influence de facteur de croissance, comme le FGF (Fibroblast Growth Factor), va engendrer la création de zones actives (Lupa et Hall, *J Neurosci*, 1989; Dai et Peng, *J Neurosci*, 1995). D'autres molécules, telles les synapsines, vont intervenir dans la maturation structurale et fonctionnelle de la région pré-synaptique (Lu et coll., *Neuroscience*, 1996).

De plus, les JNMs vont subir d'importants changements structuraux et fonctionnels durant les premières semaines postnatales. Ainsi, à la naissance, les fibres musculaires sont innervées par plusieurs terminaisons nerveuses et la membrane post-synaptique ne présente pas de replis. Par la suite, une compétition démarre entre les terminaisons nerveuses innervant la même fibre musculaire. Cette compétition vise à sélectionner la terminaison nerveuse dont les propriétés intrinsèques sont les plus en adéquation avec la fibre musculaire. Lors de la rétraction des autres fibres nerveuses, des zones de faible activité nerveuse apparaissent. Pour compenser, la membrane post-synaptique s'invagine pour former des replis parfaitement alignés sous les zones actives des terminaisons nerveuses. Les zones contenant les agrégats d'AChR prennent alors une forme dite de bretzel (Fig. 32). Les AChR s'agglutinent au sommet des replis et les canaux sodiques se concentrent au fond des plis (Steinbach, *J Physiol*, 1981; Slater, *Dev Biol*, 1982; Balice-Gordon et coll., *Neuron*, 1993). Cette conformation va augmenter la fiabilité et la vitesse de réponse post-synaptique au neurotransmetteur libéré.

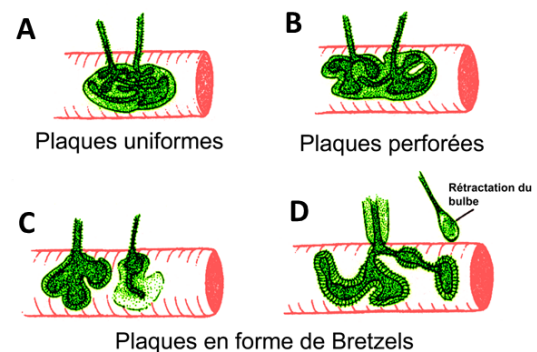


Figure 32 : différents stades de maturation des jonctions neuromusculaires. A, plaques uniformes ; B, plaques perforées ; C et D, plaques en forme de Bretzels.

En outre, les sous-unités des AChR vont changer pour passer d'une forme embryonnaire à une forme adulte. Les sous-unités γ embryonnaires vont progressivement faire place aux sous-unités ϵ durant les deux premières semaines postnatales. Ces deux sous-unités diffèrent sur le plan cinétique, au niveau de leur temps d'ouverture et de leur conductance (Siegelbaum et coll., *Dev Biol*, 1984). Cette étape est cruciale dans la mise en place des JNMs, puisque la formation des replis membranaires est très fortement réduite chez les souris invalidées pour la sous-unité ϵ du AChR. Lors de la maturation, il a été

constaté que les AChR augmentaient leur temps de demi-vie à la membrane (passage de 1 à plus de 10 jours) et devenaient plus résistants à la dispersion (Salpeter et Loring, *Prog Neurobiol*, 1985; Bloch et coll., *Soc Gen Physiol Ser*, 1997).

Par la suite, tout l'appareil post-synaptique se soulève progressivement à la surface musculaire pour former la plaque motrice. Celle-ci est composée de noyaux musculaires et d'appareils de golgi aux caractéristiques biochimiques spécialisées, dédiés aux composants synaptiques (Antony et coll., *J Cell Biol*, 1995; Jasmin et coll., *Eur J Neurosci*, 1995).

2.2.2.2. Jonctions neuromusculaires et SMA

Il a récemment été démontré qu'une réduction de la protéine SMN influait sur le fonctionnement de la jonction neuromusculaire. En effet, une diminution du niveau d'expression de la protéine SMN déclenche une diminution et une agglomération des vésicules synaptiques, réduit les zones de relargage et recyclage des vésicules et limite la maturation des neurofilaments et des microtubules synaptiques (Torres-Benito et coll., *Dev Neurobiol*, 2012).

Les souris mimant la SMA de type II présentent un retard de maturation postnatale des JNMs comparées aux souris contrôles du même âge. Tout comme dans le muscle, ce retard est beaucoup plus prononcé dans les muscles extenseurs que dans les muscles fléchisseurs (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008). En se référant à la forme des plaques de AChRs les auteurs ont décrit que les muscles des souris malades ont plus de plaques uniformes (immatures), moins de formes perforées (en cours de maturation) et moins de formes « en bretzel » (matures). En parallèle, ces souris présentent de nombreux axones terminaux larges, immatures et présentant des agrégats de filaments intermédiaires (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008; Kariya et coll., *Hum Mol Genet*, 2008; Kong et coll., *J Neurosci*, 2009; Lee et coll., *Dev Biol*, 2011). A noter que les taux entre P9 et P12 varient dans le sens d'une maturation beaucoup plus rapidement que chez les souris contrôles (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008).

Ces résultats se retrouvent également dans le modèle de souris possédant une délétion de l'exon 7 du gène *SMN* dans les neurones. Les auteurs ont observé dans ces souris malades une accumulation de neurofilaments dans les JNMs et une dénervation des muscles squelettiques (Cifuentes-Diaz et coll., *Hum Mol Genet*, 2002).

2.2.2.3. Modifications induites par l'exercice

D'un point de vue général, l'exercice physique augmente l'efficacité des JNMs (Gardiner et coll., *J Appl Physiol*, 2006). Il permet d'accroître la libération des neurotransmetteurs à la synapse et de renforcer la communication entre l'axone du motoneurone et le muscle. D'une part, on observe une augmentation du contenu en acétylcholinestérase dans le motoneurone et, d'autre part, une multiplication du nombre de AChRs à la membrane des fibres musculaires.

Par ailleurs, il a été démontré chez les souris mimant la SMA de type II que l'exercice de course améliorerait la maturation des JNMs dans les muscles sollicités (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008). En effet, les souris malades entraînées présentent plus de plaques de AChRs perforées et en forme « de bretzel » que les souris malades sédentaires. De plus, il a été observé une réduction d'environ 16% des axones terminaux larges et immatures chez ces souris entraînées (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008).

2.2.3. Motoneurones

2.2.3.1. Structure et développement

La transformation des cellules neuroépithéliales en motoneurones se fait sous l'influence d'interactions diverses dans un ordre très précis. Les facteurs neurotrophiques provenant de l'environnement proche des cellules nerveuses (signaux extrinsèques) relayés par des facteurs de transcriptions responsables de la spécification génétique (signaux intrinsèques) vont amener la cellule au phénotype motoneuronal. La suite du développement des motoneurones repose sur la mise en place du champ dendritique, des récepteurs ioniques membranaires et sur la pousse axonale.

Ainsi, le champ dendritique va permettre au motoneurone d'être connecté aux autres cellules nerveuses de son environnement proche et de réguler son activité d'entrée et de sortie de l'information nerveuse (Stuart et Hausser, *Nat Neurosci*, 2001). Le champ dendritique correspond à plus de 90% de l'aire de réception des signaux du motoneurone (Cameron et Nunez-Abades, *Brain Res Bull*, 2000). La mise en place des récepteurs ioniques membranaires va conditionner les propriétés de la membrane et la fonction du motoneurone (Perrier et Hounsgaard, *Brain Res Bull*, 2000). Enfin, la pousse axonale va permettre au motoneurone de trouver sa cible musculaire, s'y connecter puis de la contrôler. Ce sont les protéines fibreuses de la matrice extracellulaire entre les cellules qui vont permettre le guidage et la bonne navigation du cône de croissance de l'axone. Les motoneurones n'ayant pas trouvé de cible ou ne parvenant pas à s'y connecter vont dégénérer. Il semblerait que les motoneurones soient dépendants, à ce stade, des facteurs trophiques libérés par le muscle (Purves, *Nature*, 1980; Oppenheim, *Trends Neurosci*, 1989; Hamburger, *J Neurobiol*, 1992). Au cours du développement, ce phénomène naturel, appelé dégénérescence motoneuronale, affecte 50% du capital neuronal. Ce processus est observé *in vitro* sur des cultures d'embryons de poulet (Oppenheim et coll., *J Comp Neurol*, 1978) et *in vivo* chez la souris (Lance-Jones, *Brain Res*, 1982) et chez le rat (Oppenheim, *J Comp Neurol*, 1986).

La fin de la maturation des motoneurones se termine dans les premières semaines postnatales. En effet, l'activité va générer des échanges continuels entre les motoneurones et les fibres musculaires qui vont les amener à maturité. Ainsi au cours du développement postnatal, les corps cellulaires des motoneurones vont être remodelés suivant l'axe rostro-caudal : les motoneurones du tronc cérébral vont atteindre leur taille adulte en premier, puis ceux de la région cervicale, puis ceux de la région lombaire (Cameron et coll., *Neurosci Lett*, 1989; Seebach et Mendell, *J Neurophysiol*, 1996). Par conséquent, cette augmentation de taille va diminuer la résistance d'entrée et l'excitabilité des motoneurones (Viana et coll., *Neuroscience*, 1994). De plus, le champ dendritique va croître continuellement au cours du développement postnatal. Cette augmentation du diamètre des dendrites, de leur longueur et du nombre de ramifications a été observé chez le chat (Ramirez et Ulfhake, *Brain Res Dev Brain Res*, 1991) et chez la souris (Li et coll., *J Comp Neurol*, 2005). Par ailleurs, le champ dendritique est remodelé durant cette période. Un jeu de rétraction et d'élaboration de dendrites permettant d'augmenter les terminaisons nerveuses a été observé dans certaines régions du système nerveux central du rat (Nunez-Abades et coll., *J Comp Neurol*, 1994; Nunez-Abades et coll., *J Neurophysiol*, 2000).

2.2.3.2. Motoneurones et SMA

Il a été démontré que les fœtus présentant une délétion de l'exon 7 du gène *SMN* et les fœtus contrôles perdaient leurs motoneurones entre la 8^e et la 11^e semaine de gestation, au moment où l'apoptose naturelle des motoneurones débute (Soler-Botija et coll., *Brain*, 2002). En outre, le nombre de motoneurones engagés dans le processus de mort naturelle semble identique entre les malades et les témoins. Dans les SMA, le processus naturel de

dégénérescence motoneuronale semble subir une sorte d'emballlement et se prolonge bien après la 13^e semaine (Fidzianska et Rafalowska, *Acta Neuropathol*, 2002).

Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer la spécificité de l'atteinte d'un groupe de neurones dans la SMA. La première hypothèse serait qu'une réduction de SMN (Wan et coll., *Mol Cell Biol*, 2005) ou une mutation de *SMN1* (Buhler et coll., *Hum Mol Genet*, 1999) compromettrait l'assemblage des snRNP et par la suite l'activité du spliceosome. Cette diminution de l'assemblage des snRNP provoquerait une modification dans l'épissage d'un (ou des) gène(s) spécifique(s) de la circuiterie des motoneurones (Eggert et coll., *Trends Mol Med*, 2006; Gabanella et coll., *PLoS One*, 2007; Pellizzoni, *EMBO Rep*, 2007). La seconde serait que SMN est crucial pour le transport des ARNm dans les neurones et que la perturbation de cette fonction entraînerait la SMA (Fan et Simard, *Hum Mol Genet*, 2002; McWhorter et coll., *J Cell Biol*, 2003; Rossoll et coll., *J Cell Biol*, 2003; Carrel et coll., *J Neurosci*, 2006). Il est également possible que les deux hypothèses soient reliées ; une réduction de l'assemblage des snRNP pourrait influencer l'épissage d'un gène qui est important pour les axones (Burghes et Beattie, *Nat Rev Neurosci*, 2009).

Ainsi la mort neuronale chez les patients atteints de SMA de type I est 15 à 35% plus importante que chez les témoins et semble précéder l'atteinte musculaire (Fidzianska et Rafalowska, *Acta Neuropathol*, 2002). De plus, les motoneurones restants sont touchés par un dysfonctionnement prononcé (Soler-Botija et coll., *Brain*, 2002).

2.2.3.3. Modifications induites par l'exercice

D'un point de vue général, l'exercice physique engendre des modifications structurales et fonctionnelles significatives dans le système nerveux. Ceux-ci ont pour but, d'optimiser la transmission des stimuli à la fois électriques et chimiques. Il a été constaté que l'exercice physique permettait la libération de facteurs neurotrophiques, augmentait la synthèse de protéines améliorant le transport axonal bidirectionnel et activait le remodelage du cytosquelette afin d'améliorer la plasticité synaptique et restructurer l'arborisation dendritique (Gardiner et coll., *J Appl Physiol*, 2006; Ferraiuolo et coll., *J Neurochem*, 2009).

Dans le cadre de la SMA, il a été prouvé que l'exercice physique modéré était neuroprotecteur pour les souris mimant la SMA de type II (Grondard et coll., *J Neurosci*, 2005; Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008). En effet, à P10 avant l'exercice les souris malades présentent une perte des neurones de 14,8% par rapport aux souris contrôles. A P13, les souris sédentaires présentent une perte massive des neurones atteignant 35,1% par rapport aux souris contrôles. L'exercice physique limite cette perte à seulement 19,6% au même âge. De plus, l'exercice physique est bénéfique pour les motoneurones. L'analyse des neurones marqués par un anticorps anti-choline acétyltransférase (ChAT) dans les cornes ventrales de la moelle épinière lombaire montrent une perte de 24% à P10 avant l'exercice, de 37,4% à P13 pour les souris sédentaires et de 24,3% à P13 pour les souris entraînées. Ces résultats ont été confirmés par la méthode TUNEL. Le processus apoptotique chez les motoneurones des souris mimant la SMA de type II, enclenché avant P10, est quasiment stoppé par l'exercice à P13 (Grondard et coll., *J Neurosci*, 2005).

L'analyse de l'expression de 2 marqueurs du développement postnatal des motoneurones, les canaux calciques de type-L et les récepteurs à la sérotonine de type 2A (5-HT_{2A}R), nous a permis de montrer que l'exercice accélérât la maturation postnatale des motoneurones chez les souris mimant la SMA de type II (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008). Les canaux calciques de type-L migrent progressivement de la membrane périnucléaire vers la membrane plasmique durant le début du développement postnatal des motoneurones chez la souris (Jiang et coll., *Eur J Neurosci*, 1999). A P12, 76% des motoneurones des souris sédentaires mimant la SMA de type II présentent une localisation périnucléaire de ces canaux. En revanche, chez les souris malades entraînées, ce pourcentage tombe à 65%, soit le même que celui des souris contrôles (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008). De même, les

5-HT_{2A}R apparaissent sur les motoneurones entre P7 et P14 chez le rat (Vult von Steyern et Lomo, *Neuroscience*, 2005), ce qui correspond approximativement à P5-P12 chez la souris. A P12, seulement 55% des motoneurones des souris sédentaires mimant la SMA de type II présentent ce récepteur, contre 84% chez les souris contrôles. L'exercice physique fait grimper ce taux à 69% chez les souris malades (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008).

2.3. Récepteur au NMDA

Le L-glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central chez les mammifères. Il induit des changements durables de structure, d'excitabilité et de fonction des 10^{14} synapses du cerveau humain (Kandel et coll., *Essentials of neural science and behavior*, 1995). Il affecte également la survie et la migration neuronale au cours du développement (McDonald et Johnston, *Brain Res Brain Res Rev*, 1990). Ces effets sont produits par l'activation de deux classes de récepteurs au glutamate : ionotropiques, les récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NMDAR), AMPA ou Kaïnate et les récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G (Ozawa et coll., *Prog Neurobiol*, 1998).

Les NMDARs sont impliqués dans le développement du système nerveux (Balazs et coll., *Neurosci Lett*, 1989; Joo et coll., *J Cell Sci*, 2007) puis dans les phénomènes d'apprentissage, de mémoire (Bliss et Collingridge, *Nature*, 1993) et de douleur (Inturrisi, *Minerva Anesthesiol*, 2005).

2.3.1. Structure

Sept sous-unités différentes ont été découvertes dans les NMDARs : NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A et NR3B (Paoletti et Neyton, *Curr Opin Pharmacol*, 2007). Les sous-unités NR1 sont codées par un gène contenant 22 exons, qui peut produire 8 isoformes différentes par épissage alternatif (Zukin et Bennett, *Trends Neurosci*, 1995). En revanche, chaque sous-unité NR2 et NR3 est codée par un gène spécifique (Ishii et coll., *J Biol Chem*, 1993). La structure la plus communément retrouvée pour ce récepteur est un hétérotétramère composé de 2 sous-unités NR1 et deux sous-unités NR2. Cette configuration apparaît comme la plus petite organisation fonctionnelle du récepteur (Furukawa et coll., *Nature*, 2005). Les sous-unités NR1 constituent le canal ionique et possède un site de liaison à la glycine, un co-activateur. Les sous-unités NR2 forment le site de liaison au glutamate ou ses analogues. En soi, ces sous-unités ne sont pas fonctionnelles ; elles doivent être obligatoirement couplées aux sous-unités NR1 (Fig. 33). Les sous-unités NR2 peuvent, néanmoins, permettre une amplification 10 à 100 fois plus importante de la réponse du récepteur.

Le type de sous-unités NR2 conditionne la probabilité d'ouverture du canal, son temps de fermeture, la conductance ionique, la sensibilité aux ions Zn^{2+} , H^+ extracellulaires, l'interaction avec les molécules de signalisation intracellulaire et leur état de phosphorylation (Dingledine et coll., *Pharmacol Rev*, 1999; Cull-Candy et Leszkiewicz, *Sci STKE*, 2004). Ainsi, l'hétérotétramère le moins sensible au NMDA est NR1/NR2C puis de manière croissante NR1/NR2D, NR1/NR2A puis pour finir le plus sensible, NR1/NR2B (Laurie et Seeburg, *Eur J Pharmacol*, 1994). La réponse aux ions est également différente en fonction de la composition de l'hétérotétramère. En effet, NR1/NR2A et NR1/NR2B sont extrêmement sensibles au Mg^{2+} et sont inhibées rapidement et seul le courant de NR1/NR2B est potentialisé par la présence de Ca^{2+} extracellulaire (Ishii et coll., *J Biol Chem*, 1993). Par ailleurs, les NMDARs sont directement couplés à la voie de signalisation ERK par l'interaction directe entre la sous-unité NR2B et RasGRF1 (Krapivinsky et coll., *Neuron*, 2003).

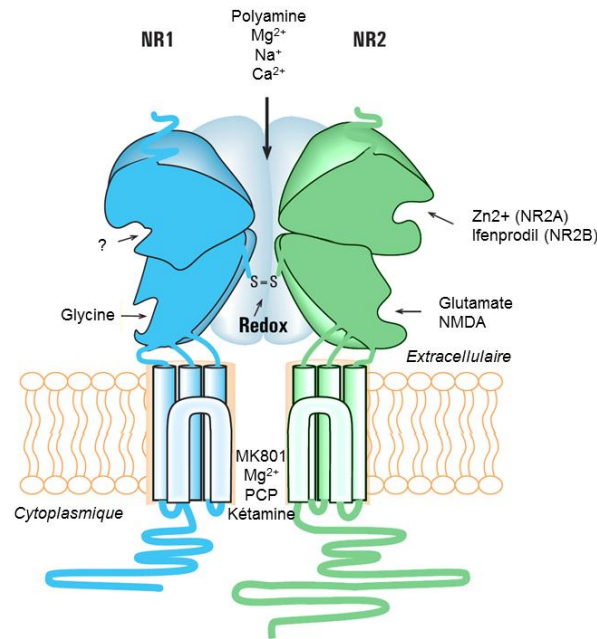


Figure 33 : représentation schématique du récepteur au NMDA.

(Kemp et McKernan, *Nat Neurosci*, 2002; Chen et Lipton, *J Neurochem*, 2006)

Les sous-unités NR3 modulent la composition en sous-unités NR2, la localisation et la perméabilité au Ca^{2+} des NMDARs (Perez-Otano et coll., *J Neurosci*, 2001). Les hétérotétramères NR1/NR3 fonctionnent comme des canaux ioniques. Ils sont activés par la glycine, sont insensibles à l'inhibition du Mg^{2+} et laissent passer les cations, sauf le Ca^{2+} (Chatterton et coll., *Nature*, 2002). La sous-unité NR3A serait un suppresseur des canaux NR1/NR2 (Ciabarra et coll., *J Neurosci*, 1995; Sucher et coll., *J Neurosci*, 1995) et NR3B contrôlerait la perméabilité au Ca^{2+} (Matsuda et coll., *J Neurosci*, 2003) et, dans certains cas, serait un inhibiteur de la fonction du NMDAR (Andersson et coll., *Genomics*, 2001; Nishi et coll., *J Neurosci*, 2001).

En outre, les NMDARs nécessitent un co-agoniste, la glycine (Monyer et coll., *Science*, 1992). Ils sont très perméables au Ca^{2+} lorsque les cellules pré et post-synaptiques sont excitées (Kohr, *Cell Tissue Res*, 2006) et sont inhibés au niveau du canal par des concentrations physiologiques de Mg^{2+} (Monyer et coll., *Science*, 1992).

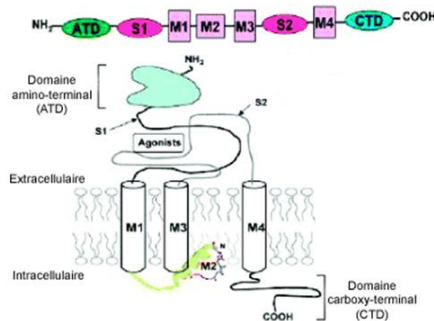


Figure 34 : sous-unité du récepteur au NMDA.

Chaque sous-unité est composée de 3 domaines transmembranaires (domaines 1, 3 et 4) et une boucle entrant dans la face intracellulaire de la couche lipidique (domaine 2) (Fig. 34). Les domaines transmembranaires sont hydrophobes et composés d'environ 20 acides aminés enchâssés dans la bicouche lipidique. Une longue séquence d'acides aminés relie, du côté extracellulaire, la section transmembranaire 3 de la section transmembranaire 4 (Chen et Wyllie, *Br J Pharmacol*, 2006). Cette structure caractéristique est retrouvée chez les récepteurs au GABA, à la Glycine ou à l'acétylcholine. Par ailleurs, toutes les sous-unités du NMDAR possèdent une asparagine dans le domaine 2, qui borde le pore du canal. Le remplacement de cet acide aminé chez les sous-unités NR1 ou NR2B réduit la perméabilité au Ca^{2+} et la sensibilité au blocage par le Mg^{2+} (Liu et Zhang, *Chin Med J (Engl)*, 2000).

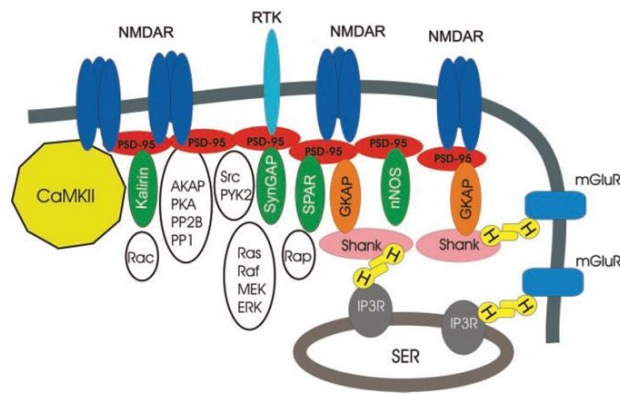


Figure 35 : schéma du complexe protéique associé au NMDAR.

(Sheng et Kim, *Science*, 2002)

La région carboxyterminale des sous-unités NR1 et NR2 se trouve en aval de la section transmembranaire 4, du côté intracellulaire. Elle contient des domaines tyrosine et sérine phosphorylables et peut également interagir avec les domaines PDZ des MAGUK (Membrane associated guanylates kinases) (Ziff, *Neuron*, 1997; Sheng et Kim, *Science*, 2002; Gardoni, *Eur J Pharmacol*, 2008). Ces dernières font le lien entre les NMDARs et les molécules de transduction du signal, telle la protéine CaMKII (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases II) (Gardoni et coll., *J Neurochem*, 1998; Strack et Colbran, *J Biol Chem*, 1998; Gardoni et coll., *J Neurosci*, 2001; Thalhammer et coll., *EMBO J*, 2006), PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase) ou bien encore les MAP-Kinases (Mitogen Activated Protein Kinase) (Sutton et Chandler, *J Neurochem*, 2002; Krapivinsky et coll., *Neuron*, 2003). De plus, les MAGUK servent de protéine d'ancrage et retiennent les NMDARs à la synapse (Kennedy, *Brain Res Brain Res Rev*, 1998). Une protéine importante dans l'organisation des complexes est PSD-95 qui relie la partie C-terminale de la sous-unité NR2 à différentes protéines cytoplasmiques et enzymes (Kornau et coll., *Science*, 1995; Kennedy, *Brain Res Brain Res Rev*, 1998; Sheng et Kim, *Science*, 2002). Ainsi cette protéine d'échafaudage transmet différents signaux extracellulaires, indépendamment du calcium, vers le noyau afin de réguler l'activité et la plasticité synaptique (Fig. 35) (Vissel et coll., *Nat Neurosci*, 2001; Sheng et Kim, *Science*, 2002). Par exemple, un des composants du complexe PSD-95, appelé AIDA1d, déclenche la synthèse protéique en se liant aux corps de Cajal lors de la formation des nucléoles (Jordan et coll., *Nat Neurosci*, 2007) ; un autre, AKAP 150, se lie à PKA et EPAC1/2, deux protéines qui exercent un effet antagoniste sur l'activation de AKT (Lu et coll., *J Physiol*, 2008; Nijholt et coll., *Cell Signal*, 2008).

2.3.2. Expression développementale

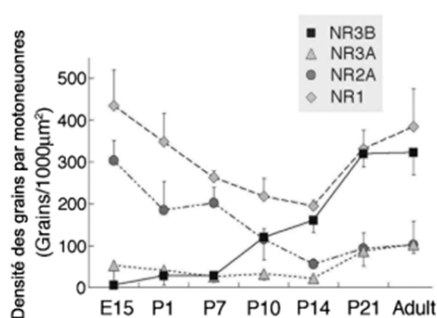


Figure 36 : niveaux d'expression de NR3B, NR3A, NR2A, et NR1 dans la moelle lombaire de la souris au cours du développement. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

Au cours du développement de la moelle épinière chez les rongeurs et les humains, les sous-types de récepteurs NMDA sont exprimés de manière synchronisée et en grande quantité (Kalb et Fox, *J Comp Neurol*, 1997). Puis, leur nombre, leur affinité pour le Mg^{2+} et leur dépendance au voltage chute au cours du développement embryonnaire (Kirson et coll., *J Physiol*, 1999; Palecek et coll., *Eur J Neurosci*, 1999; Vinay et coll., *Eur J Neurosci*, 2000; Vinay et coll., *Brain Res Bull*, 2000; Fukaya et coll., *Eur J Neurosci*, 2005). La distribution et l'expression séquentielle des ARNm de chaque sous unité ont été décrites dans le système nerveux central de souris (Fig. 36) (Fukaya et coll., *Eur J Neurosci*, 2005).

Dans les premiers stades embryonnaires, l'activation des NMDARs est requise notamment pour la prolifération puis la différenciation des cellules neurales progénitrices néocorticales (Cameron et coll., *J Neurosci*, 1995; Cameron et coll., *J Neurobiol*, 1998).

Il a été décrit que les sous-unités NR1, à E15, étaient exprimées de manière ubiquitaire dans le système nerveux central. De plus, leur expression ne subit pas de changement drastique au cours du développement et de la maturation postnatale (Watanabe et coll., *Neuroreport*, 1992; Fukaya et coll., *Eur J Neurosci*, 2005). En revanche, les expressions des sous-unités NR2 et NR3 sont restreintes à certaines régions et varient au cours du développement. A E15, la sous-unité NR2A prédomine dans les motoneurones de la moelle épinière, NR2B est exprimée dans tout le cerveau, NR2D se retrouve dans le diencephale et le tronc cérébral, NR3A est présente dans de nombreuses régions du cerveau et NR3B ne s'exprime quasiment pas (Watanabe et coll., *J Comp Neurol*, 1994; Chatterton et coll., *Nature*, 2002; Fukaya et coll., *Eur J Neurosci*, 2005). A noter, que l'expression trop prolongée de NR2B dans le cervelet altère le développement des cellules granulaires et conduit à une régulation négative de l'expression de NR2A et, à long terme, des déficits moteurs (Schlett et coll., *Mol Cell Neurosci*, 2004).

Durant une courte période du début de la vie postnatale, lorsque les membres sont employés pour les premiers déplacements, les motoneurones se développent en fonction de l'activité (Westerga et Gramsbergen, *Brain Res Dev Brain Res*, 1990). Ceci conduit à l'acquisition des propriétés moléculaires, physiologiques et anatomiques définitives des cellules nerveuses. Ce procédé nécessite l'activation du récepteur NMDA (Kalb et Hockfield, *Dev Biol*, 1994). Par conséquent, on observe des changements des profils d'expression de ses sous-unités. Ainsi, l'expression de la sous-unité NR2A chute dans la moelle épinière et augmente dans la totalité du cerveau (Fukaya et coll., *Eur J Neurosci*, 2005). En parallèle, l'expression de NR3B se déclenche dans les motoneurones dès P10. La sous-unité NR2B est principalement retrouvée au niveau du cerveau antérieur, NR2C apparaît exclusivement au niveau du cervelet et NR2D disparaît progressivement.

A l'âge adulte, la sous-unité NR2A est exprimée de manière ubiquitaire dans tout le système nerveux central. Son expression est accrue dans le cortex cérébral, l'hippocampe et les cellules granulaires cérébelleuses. NR2B est exprimée majoritairement dans le cortex, l'hippocampe, le septum, le bulbe olfactif et le thalamus. NR2C se retrouve dans le cervelet, le bulbe olfactif et le thalamus. Enfin, NR2D est exprimée dans tout le système nerveux, mais faiblement dans le thalamus, le tronc cérébral et la moelle épinière.

2.3.3. Activité pro- ou anti-apoptotique

Les NMDARs peuvent jouer deux rôles totalement opposés. D'une part, l'activité des NMDARs est indispensable à la survie des neurones dans plusieurs contextes de développement (Ikonomidou et coll., *Science*, 1999; Wolpaw et Tennissen, *Annu Rev Neurosci*, 2001), à la régénération ou la neurogenèse chez l'adulte (Cameron et coll., *J Neurosci*, 1995; Gould et coll., *J Neurosci*, 1997; Arvidsson et coll., *Eur J Neurosci*, 2001).

D'autre part, l'activation prolongée des NMDARs entraîne un type particulier de mort des neurones appelée excitotoxicité (Choi, *Neuron*, 1988; Olney, *Prog Brain Res*, 1990). Ce phénomène d'entrée trop massive de Ca^{2+} semble être impliqué dans la progression de plusieurs maladies neurodégénératives, comme les maladies de Parkinson, Alzheimer, Hutchinson, la SLA, l'épilepsie, ainsi que dans les dommages causés au cerveau après un accident vasculaire cérébral (Doble, *Pharmacol Ther*, 1999; Larsen et coll., *J Comp Neurol*, 2000; Adlard et coll., *J Neurosci*, 2005; McCrate et Kaspar, *Neuromolecular Med*, 2008). Cet effet est également retrouvé au niveau du système nerveux périphérique. Ainsi, le blocage pharmacologique des NMDARs après une lésion du nerf sciatique chez le rat, protège une large part des motoneurones destinés à la mort cellulaire. De plus, la perte musculaire associée à cette lésion du nerf est fortement réduite en limitant l'effet excitotoxique du

glutamate (Mentis et coll., *Neuroscience*, 1993; Dick et coll., *Neuromuscul Disord*, 1995). Ce phénomène néfaste serait lié, entre autre, à une distribution spatiale et une composition en sous-unités anormales des NMDARs (Kennedy, *Brain Res Brain Res Rev*, 1998; Steigerwald et coll., *J Neurosci*, 2000).

Par exemple, afin d'illustrer ce double rôle, il a été démontré que les jeunes neurones corticaux pourvus de NMDARs composés de NR2A exprimaient des voies anti-apoptotiques, notamment par l'intermédiaire de AKT. A l'inverse, ceux pourvus de NMDARs composés de NR2B entraînent dans des phénomènes d'apoptose (Liu et coll., *J Neurosci*, 2007). Cependant, ces effets sont opposés chez les neurones corticaux matures : NR2B permet, cette fois-ci, le déclenchement des voies anti-apoptotiques (Sinor et coll., *J Neurosci*, 2000). De même, il a été démontré très tôt que dans les cellules granulaires du cervelet, que l'activation des NMDARs pouvait induire soit une neuroprotection, soit une neurotoxicité, en fonction du degré de stimulation des récepteurs (Balazs et coll., *Neurosci Lett*, 1989; Marini et Paul, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992).

2.3.4. Récepteur au NMDA et SMA

Chez les souris mimant la SMA de type II l'expression des sous-unités des NMDARs est modifiée. En effet, les ARNm codant NR2A et la protéine résultante sont particulièrement peu exprimés dans les motoneurons lombaires de ces souris malades (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008). A l'inverse les niveaux d'expression des sous-unités NR1 et NR3B sont identiques aux souris contrôles. A noter qu'il semble même que le transport du glutamate soit perturbé chez les patients atteints de SMA de type I (Hayashi et coll., *Brain Dev*, 2002).

Par ailleurs, la stimulation des NMDARs induit une augmentation du nombre de gems et de la transcription de SMN, via l'activation de son promoteur. Le niveau de SMN est dépendant de l'activité synaptique. Ce qui implique, en retour, que SMN doit avoir des fonctions neurone-spécifiques importantes en aval de l'activation synaptique (Andreassi et coll., *Neurogenetics*, 2002).

2.3.5. Modification induites par l'exercice sur les NMDAR

L'exercice physique est capable d'augmenter l'expression du gène codant pour la sous-unité NR2A dans les motoneurons des souris contrôles et mimant la SMA de type II. Ainsi, si l'on prend 100% comme taux de référence chez les souris contrôles, l'expression du gène *NR2A* passe de 15% chez les souris sédentaires à 50% chez les souris entraînées (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008).

Les NMDARs, eux-mêmes, font partis des acteurs principaux de l'exercice. En effet, un blocage spécifique de ces récepteurs par du MK801 lors de l'exercice abolit les effets bénéfiques sur la durée de vie, la prise de poids, la maturation des composants de l'unité motrice et la neuroprotection chez les souris mimant la SMA de type II (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008). Ces résultats sont à relier au fait que la stimulation des NMDARs augmente l'expression du gène *SMN* (Andreassi et coll., *Neurogenetics*, 2002; Branchu et coll., *J Neurosci*, 2010).

2.4. Récepteur à l'IGF-1

2.4.1. L'Insulin-like Growth Factor-1

L'Insulin-like Growth Factor I (IGF-1) est un facteur de croissance peptidique ayant une structure similaire à l'insuline. L'IGF-1 est sécrété principalement par le foie sous le contrôle de l'hormone de croissance neuroendocrine (GH pour Growth Hormone) (Yakar et

coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999). Cependant, il est aussi faiblement sécrété par de nombreux types cellulaires tels les cellules gliales, les fibres musculaires ou bien encore, les cellules tumorales (Tanaka et coll., *Xenobiotica*, 1999). Cette hormone possède un très large spectre d'action ; elle peut agir de manière autocrine, paracrine et, une fois libérée dans la circulation sanguine, endocrine. Les IGFBP (Insulin-like Growth Factor Binding Protein) potentialisent son effet en la protégeant de la dégradation ou, à l'inverse, inhibent son effet en l'empêchant de se fixer à son récepteur spécifique, le récepteur de l'IGF-1 (IGF-1R) (Jones et Clemmons, *Endocr Rev*, 1995). Par ailleurs, l'IGF-1 peut également se lier, avec une moindre affinité, aux récepteurs de l'IGF-2 (IGF-2R) ou de l'insuline (IR).

L'IGF-1 est synthétisé en très grande quantité au cours du développement fœtal. Par la suite, le niveau d'IGF-1 circulant dans le sang décroît au cours de la vie postnatale. A noter, que durant les périodes embryonnaire et postnatal, l'IGF-1 est synthétisé directement au niveau du système nerveux central ; mais à l'âge adulte, il est apporté quasi-exclusivement par la circulation sanguine (Carro et Torres-Aleman, *Keio J Med*, 2006). Il a été prouvé que l'IGF-1 est essentiel pour la croissance et la régulation du métabolisme des mammifères (Jones et Clemmons, *Endocr Rev*, 1995; Zhu et coll., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008). Son récepteur est présent à la surface de nombreux types cellulaires, de ce fait, son action a lieu dans tout l'organisme (Bondy et coll., *Neuroscience*, 1992). Ainsi, l'IGF-1 régule la prolifération, la croissance, la motilité ainsi que la survie des cellules en fonction de leur type et de leur état de différenciation.

Durant la période embryonnaire, l'IGF-1 déclenche la croissance axonale et la formation des synapses des motoneurones (Ozdinler et Macklis, *Nat Neurosci*, 2006). A l'âge adulte, IGF-1 agit comme un neuromodulateur dans les motoneurones en régulant l'activité de l'acide glutamique décarboxylase et de l'acétylcholine transférase (ChAT) (Bilic et coll., *Eur J Neurol*, 2006). De plus, l'IGF-1 assure la survie des motoneurones après un traumatisme. En effet, il est capable de réguler le trafic membranaire des récepteurs aux neurotransmetteurs, de moduler l'excitabilité des neurones en interagissant avec les canaux ioniques membranaires et d'activer les cellules gliales qui participent aux réparations après un dommage cérébral (Dore et coll., *Trends Neurosci*, 1997; Carro et Torres-Aleman, *Keio J Med*, 2006). Au niveau périphérique, l'IGF-1 est capable de stimuler la différenciation et la prolifération des cellules musculaires lisses et squelettiques (Florini et coll., *Endocr Rev*, 1996; Yamane et coll., *Arch Oral Biol*, 2000; Chin et coll., *Eur J Pharmacol*, 2009; Duan et coll., *Gen Comp Endocrinol*, 2010) ainsi que les changements de masse et de phénotype dans les muscles squelettiques adultes (Lalani et coll., *J Endocrinol*, 2000; Olson et Williams, *Cell*, 2000).

De même, il a été démontré qu'un traitement à l'IGF-1 induisait la prolifération d'un vaste panel cellulaire : chondrocytes, ostéoblastes, kératinocytes, cellules thyroïdiennes, cellules des épithéliums mammaires, cellules progénitrices des érythrocytes, cellules du thymus, ovocytes, cellules de la granulosa, cellules de Sertoli, spermatogonies et plusieurs lignées de cellules cancéreuses (Sara et Hall, *Physiol Rev*, 1990; Lowe, *CRC Press, Boca Raton*, 1991; Giudice, *Endocr Rev*, 1992; McCauley, *Br J Cancer*, 1992; Cohick et Clemmons, *Annu Rev Physiol*, 1993).

La surexpression de l'IGF-1 humain dans des souris transgéniques déclenche une augmentation de leur poids de 30%. Les auteurs ont également observé un accroissement de la masse et de la taille du cerveau, du foie et des muscles (Mathews et coll., *Endocrinology*, 1988; Coleman et coll., *J Biol Chem*, 1995; Barton-Davis et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998; Musaro et coll., *Nat Genet*, 2001). A l'inverse l'inactivation totale du gène codant pour IGF-1 entraîne un retard de croissance dès le stade embryonnaire E13.5 et une diminution de 40% de poids des souris transgéniques par rapport aux souris contrôles. De plus, cette inactivation augmente fortement le taux de décès des souriceaux après la naissance (Baker et coll., *Cell*, 1993; Liu et coll., *Cell*, 1993).

2.4.2. Structure du IGF-1R

L'IGF-1R est un holorécepteur homodimérique à activité tyrosine kinase. Il est synthétisé à partir d'une seule chaîne polypeptidique. Durant la maturation post-traductionnelle, une séquence signal de 30 acides aminés est excisée et la chaîne du pro-récepteur est clivée. Une séquence de 706 acides aminés formera la sous-unité α et une autre de 626 acides aminés formera la sous-unité β . Chaque monomère est composé d'une sous-unité α liée à une sous-unité β par un pont disulfure.

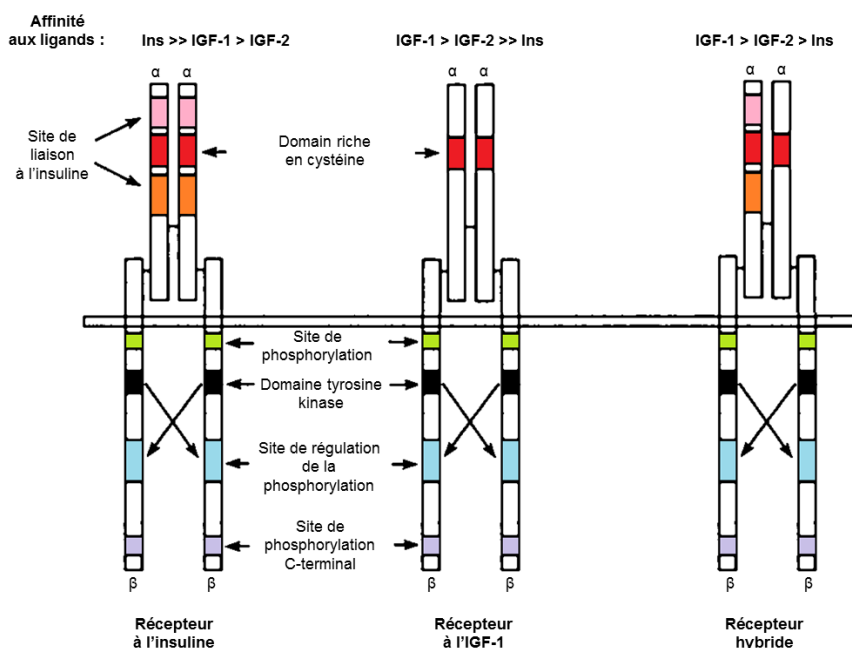


Figure 37 : caractéristiques structurales des récepteurs de l'insuline, l'IGF-I et hybrides. Comme indiqué, les trois récepteurs sont constitués de deux sous-unités α extracellulaires et deux sous-unités β -transmembranaires.

La sous-unité α , extracellulaire, forme le site de fixation spécifique au ligand. La sous-unité β transmembranaire, possède l'activité tyrosine kinase sur son domaine cytoplasmique. L'IGF-1R mature est sous la forme $\alpha_2\beta_2$; il possède 50-60% d'homologie de séquence générale avec l'IR et 84% au niveau du domaine tyrosine kinase (Fig. 37). C'est pourquoi, il n'est pas rare de trouver des récepteurs hybrides constitués d'un monomère d'IGF-1R et d'un monomère d'IR (Jones et Clemmons, *Endocr Rev*, 1995).

La partie cytoplasmique de la sous-unité β contient un domaine catalytique tyrosine kinase hautement conservé. Lors de la liaison entre l'IGF-1R et l'IGF-1, le signal intracellulaire est initié par la transautophosphorylation du récepteur au niveau de résidus tyrosine et sérine (Kato et coll., *J Biol Chem*, 1993). Le récepteur constitue alors un site d'ancrage pour les protéines IRS (Insulin Receptor Substrat) et SHC (Kooijman, *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006; Chitnis et coll., *Clin Cancer Res*, 2008). A ce stade, trois voies majeures de signalisation peuvent ainsi être activées indépendamment : la voie JAK/STAT (Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) directement via le domaine tyrosine kinase ; la voie MEK/ERK (MAP kinase kinase/Extracellular-Signal Regulated Kinase) via SHC, puis Ras et, enfin, la voie PI3K/AKT (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase/AKT) via IRS-1 (Zhang et coll., *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2004; Subramaniam et coll., *J Neurosci*, 2005; Zaka et coll., *Mol Cell Neurosci*, 2005).

L'inactivation totale du gène codant pour l'IGF-1R est létale. Les souris possédant cette inactivation ont un retard de croissance dès le stade embryonnaire E11.0. A la naissance, celle-ci ont une diminution du poids de -65% par rapport aux souris contrôles. De plus, ces souris IGF-1R^{-/-} décèdent d'insuffisance respiratoire juste après la naissance (Baker et coll., *Cell*, 1993; Liu et coll., *Cell*, 1993). A l'inverse, l'inactivation partielle de l'IGF-1R se révèle bénéfique (Holzenberger et coll., *Nature*, 2003). En effet, les souris hétérozygotes pour l'inactivation à l'IGF-1R vivent 26% plus longtemps que les souris contrôles (+33% pour les femelles et +16% pour les mâles) (Fig. 38A et B). Ces souris transgéniques ont un métabolisme énergétique, une prise de nutriments, une activité

physique et une fertilité normaux (Fig. 38C). Seules les souris *IGF-1R*^{+/-} mâles présentent un poids légèrement inférieur aux souris contrôles après le sevrage. En outre, les souris *IGF-1R*^{+/-} développent une grande résistance au stress oxydant (Holzenberger et coll., *Nature*, 2003).

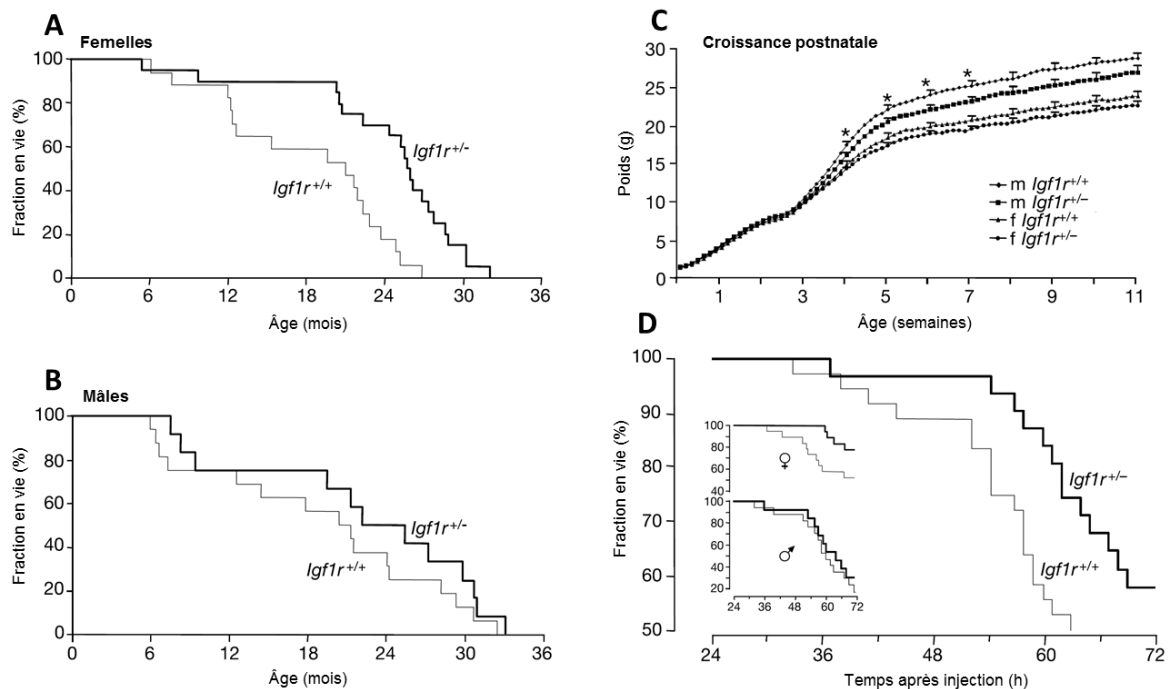


Figure 38 : les mutants hétérozygotes pour IGF-1R vivent plus longtemps et sont plus résistants au stress oxydant. A et B, augmentation de la durée de vie des souris *Igf1r*^{+/-} femelles (A) et mâles (B) par rapport aux souris *Igf1r*^{+/+}. C, croissance postnatale des souris *Igf1r*^{+/-} et *Igf1r*^{+/+}. A partir de la 4^e semaine les souris mâles *Igf1r*^{+/-} présentent un poids significativement inférieur aux souris mâles *Igf1r*^{+/+}. D, Un stress oxydant est induit par une injection intrapéritonéale de paraquat (70mg/kg) ; les souris *Igf1r*^{+/-} résistent mieux au stress, en particulier les femelles.

(Holzenberger et coll., *Nature*, 2003)

2.4.3. Voie IGF-1 et SMA

Différentes études suggèrent qu'il existe une perturbation de la signalisation IGF-1 dans un contexte de SMA. En effet, le niveau d'IGF-1 circulant et l'expression hépatique des ARN messagers codants pour IGF-1 sont grandement réduits dans un modèle de souris mimant la SMA sévère (Hua et coll., *Nature*, 2011; Murdocca et coll., *Mol Med*, 2012). En outre, comme l'IGF-1 stimule la prolifération des myoblastes, induit la différenciation myogénique et l'hypertrophie des myocytes *in vivo* et *in vitro*, l'augmentation de l'expression de cette hormone dans les muscles de souris mimant la SMA a été récemment évaluée (Bosch-Marce et coll., *Hum Mol Genet*, 2011). Il s'avère que les souris mimant la SMA de type II surexprimant l'IGF-1 dans le muscle, montrent un élargissement des fibres musculaires et une augmentation de la durée de vie de 40%. En revanche, ce phénomène n'est pas associé à une amélioration de la motricité, ni à une augmentation de l'expression du gène *SMN2* ou de la protéine SMN. De plus, il a été constaté par les mêmes auteurs que l'IGF-1R était plus exprimé dans le quadriceps des souris mimant la SMA que dans ceux des souris contrôles.

moelle épinière, étaient tous les deux bénéfiques dans un modèle de souris mimant la SLA. Cependant, lorsque les deux sont combinés, les auteurs ont observé des bénéfices plus importants. Cela suggère donc l'intervention de mécanismes différents (Kaspar et coll., *Ann Neurol*, 2005). Ainsi, l'exercice physique activerait des mécanismes dépendants et indépendants de l'IGF-1 simultanément et ceux-ci varieraient, entre autre, en fonction de l'intensité de l'exercice pratiqué (Trejo et coll., *Mol Cell Neurosci*, 2008; Llorens-Martin et coll., *Mol Cell Neurosci*, 2010).

PROBLÉMATIQUE

Plusieurs études montrent que l'exercice physique peut être neuroprotecteur. En effet, l'activité physique atténue les déficits moteurs (Klintsova et coll., *Brain Res*, 1998), améliore aussi les capacités cognitives chez les personnes âgées (Kramer et coll., *Nature*, 1999) et limite les détériorations neurologiques lors de processus neurodégénératifs (Arkin, *Gerontologist*, 1999; Larsen et coll., *J Comp Neurol*, 2000). Il a récemment été démontré au laboratoire que l'exercice physique était bénéfique pour des souris mimant la SMA de type II (Grondard et coll., *J Neurosci*, 2005; Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008). Il a été constaté une augmentation de la durée de vie, une neuroprotection des motoneurones lombaires, une accélération de la maturation des unités motrices chez ces souris. En outre, l'expression de la protéine SMN est amplifiée dans la moelle épinière lombaire suite à un exercice physique quotidien.

Il n'existe aucun traitement efficace contre la SMA. Une activité physique adaptée constituerait une alternative permettant de limiter certains symptômes et éventuellement améliorer la durée de vie des patients. Cependant, l'exercice physique ne peut être proposé à tous les individus atteints de SMA, en particulier ceux atteints de forme sévère. C'est pourquoi l'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogenèse de la maladie et ceux activés par l'exercice revêt un intérêt indéniable. La compréhension de ces mécanismes, jusqu'alors inconnus, nous permettrait de mieux appréhender la physiopathologie de cette maladie et de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

C'est dans ce contexte scientifique, que s'inscrit mon travail. Afin de répondre à cette problématique, nous avons divisé notre recherche en trois temps. Comme l'inhibition des NMDARs abolit une grande part des effets bénéfiques de l'exercice (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008), nous avons évalué, dans un premier temps, les effets d'une activation des NMDARs dans des modèles murins mimant les SMA de type I et type II. Nous nous sommes penchés sur les modifications de l'unité motrice dans son ensemble dans la période suivant le traitement. De plus, nous avons décrypté une part des cascades moléculaires déclenchées par l'activité des NMDARs et aboutissant à l'expression accrue de la protéine SMN.

Puis, dans un second temps, au regard de la surexpression de ERK dans la moelle épinière des modèles murins mimant la SMA et sa diminution lors de l'activation des NMDARs, nous avons analysé les effets d'une inhibition de ERK. Des souris ont été traitées par des injections intrathécales de U0126 ou *per os* avec de l'AZD6244. Nous avons suivi le développement et la survie des motoneurones chez les souris malades ou contrôles. De plus, nous avons mis en évidence, pour la première fois, la compétition entre les voies MEK/ERK/Elk-1 et PI3K/AKT/CREB pour la régulation de l'expression du gène *SMN2*. Un phénomène que nous avons confirmé dans des cultures de cellules musculaires issues de patients atteints de SMA de type II.

Enfin, dans un dernier temps, nous nous sommes attachés à caractériser précisément les effets induits par une diminution des IGF-1Rs, comme observé lors de l'exercice. Nos approches ont porté sur l'analyse des modifications de l'unité motrice à P12 et le décryptage des voies moléculaires induites par une diminution constitutive des IGF-1Rs et l'étude de l'expression de SMN.

Afin d'évaluer l'impact de l'activation des NMDARs ou de la diminution des IGF-1Rs nous avons utilisé le modèle murin mimant la SMA développé par l'équipe de Hung Li (Hsieh-Li et coll., *Nat Genet*, 2000). Ces souris, précédemment utilisées pour déterminer les

bienfaits de l'exercice physique, ont une construction génétique (*Smn* ^{$\Delta 7/\Delta 7$} ; *SMN2*) qui se rapproche des caractéristiques génétiques de la maladie humaine. Ces souris présentent une hypotonie marquée dès 8-10 jours et ne sont différenciables des autres souris témoins avant 7 jours postnatals. On retrouve dans ce modèle une grande majorité des aspects cellulaires décrits dans la SMA humaine comme l'atteinte privilégiée des motoneurons spinaux. Ce type de souris a d'abord été comparé à la SMA de type II de l'humain (Hsieh-Li et coll., *Nat Genet*, 2000) et est considéré aujourd'hui comme un type sévère. La mort des souriceaux survient aux alentours de 12 jours.

L'étude de l'activation des récepteurs au NMDA a également été menée sur le modèle murin mimant la SMA développé par l'équipe d'Arthur Burghes (Monani et coll., *Hum Mol Genet*, 2000), tout comme l'étude des effets de l'inhibition de ERK. Ce modèle souris correspond au type le plus sévère de SMA, assimilable au type 0 chez l'humain. Un protocole d'entraînement n'est pas envisageable dans ce modèle. Cependant, ces souris permettent d'évaluer des traitements pharmacologiques dans un contexte de SMA sévère et à des stades très précoces. La construction génétique (*Smn*^{-/-}; *SMN2*) ressemblent également aux caractéristiques génétiques de la maladie humaine. Une hypotonie sévère dès la naissance ainsi qu'une atteinte privilégiée des motoneurons spinaux sont observées chez ces souris. Ce type sévère de la maladie, induit la mort du souriceau aux alentours de 2 jours.

Les analyses des voies moléculaires qui conduisent à l'expression de la protéine SMN ont systématiquement été confirmées et complétées *in vitro* par des cocultures moelle épinière-muscles, des cultures de cellules musculaires issues de patients SMA de type II ou des cultures de cellules MN1.

RÉSULTATS

3. ARTICLE 1

***In Vivo* NMDA Receptor Activation Accelerates Motor Unit Maturation, Protects Spinal Motor Neurons, and Enhances SMN2 Gene Expression in Severe Spinal Muscular Atrophy Mice**

**Julien Branchu^{1*}, Olivier Biondi^{1*}, Gabriel Sanchez³,
Camille Lancelin¹, Séverine Deforges¹, Philippe Lopes^{1,2},
Claude Pariset¹, Sylvie Lécolle¹, Jocelyn Côté³,
Christophe Chanoine¹ et Frédéric Charbonnier¹**

* J.B. and O.B. ont contribué de manière égale à ce travail.

¹ Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saints-Pères, Laboratoire de Neurobiologie des Réseaux Sensorimoteurs, Unité Mixte de Recherche 7060, Centre National de la Recherche Scientifique, F-75270 Paris Cedex 06, France,

² Université d'Evry-Val-d'Essonne, F-91025 Evry, France,

³ Centre for Neuromuscular Disease and Department of Cellular and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Ottawa, Ottawa, Ontario K1H 8M5, Canada.

3.1. Introduction à l'article 1

Effet de l'activation des NMDARs dans des modèles souris mimant la SMA.

L'exercice physique induit chez les souris mimant la SMA de type II une augmentation de la durée de vie, une neuroprotection des motoneurones et une accélération de la maturation postnatale des composants de l'unité motrice. De plus, il ré-augmente considérablement l'expression de la sous-unité activatrice NR2A du récepteur au NMDA dans la moelle épinière de ces souris. Ce récepteur est crucial, puisque son inhibition, par du MK801, chez les souris entraînées annule une grande partie des effets bénéfiques de l'exercice. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'activité des unités motrices, induite par l'exercice physique via le récepteur au NMDA, pourrait accélérer leur maturation postnatale et limiter les atteintes de la maladie.

C'est pourquoi, nous avons évalué les effets de l'activation des récepteurs au NMDA dans un contexte de SMA. D'une part, nous avons sélectionné deux modèles souris invalidés pour le gène *Smn* murin et possédant des transgènes humains *SMN2*. Les souris développées par l'équipe de A. Burghes meurent dans les 2 jours suivants leur naissance et miment la SMA de type I. Les souris développées par l'équipe de H. Li meurent à 11,4 jours en moyenne et miment la SMA de type II. D'autre part, nous avons réalisé des co-cultures myotubes/explants de moelle épinière d'embryon de souris mimant la SMA de type I.

Nous avons administré tous les jours en intrathécal 5pmol/g de NMDA à ces souris. Le traitement des souris mimant la SMA de type I commençait à la naissance et celui des souris mimant la SMA de type II commençait au début de leur phase symptomatique, à 8 jours. Afin d'évaluer l'impact de l'activation *in vivo* des récepteurs au NMDA, nous avons suivi une approche pluridisciplinaire, associant des analyses comportementales à des analyses cellulaires et moléculaires.

Les études comportementales incluaient la mesure de la durée de vie, de la force et de l'activité spontanée des souris traitées au NMDA par rapport aux souris traitées avec un placebo. Les analyses cellulaires se sont déroulées à 3 niveaux : celui des muscles squelettiques, celui des motoneurones et celui de leurs jonctions. Ainsi nous avons observé l'impact de cette activation sur la morphologie des fibres de trois muscles squelettiques de la patte arrière, un extenseur lent, le *soleus* ; un extenseur rapide, le *plantaris* et un fléchisseur rapide, le *tibialis*. De même, nous avons observé le nombre et la morphologie des motoneurones spinaux. Enfin, nous avons observé la morphologie des jonctions neuromusculaires dans les trois muscles cités précédemment.

Nous avons étudié, par la suite, la transcription et le profil d'épissage du transgène *SMN2* dans la moelle épinière lombaire les deux modèles souris traités au NMDA. Puis nous avons décrypté une part des voies déclenchées par l'activation des récepteurs au NMDA et impliquées dans l'expression accrue de la protéine SMN. Le rôle de chaque molécule clef a été confirmé par des séries d'inhibition spécifique *in vitro*, dans les co-cultures.

C'est le premier article prouvant qu'une activation adéquate des récepteurs au NMDA est bénéfique dans un contexte de SMA.

In Vivo NMDA Receptor Activation Accelerates Motor Unit Maturation, Protects Spinal Motor Neurons, and Enhances SMN2 Gene Expression in Severe Spinal Muscular Atrophy Mice

Olivier Biondi,^{1,*} Julien Branchu,^{1,*} Gabriel Sanchez,³ Camille Lancelin,¹ Séverine Deforges,¹ Philippe Lopes,^{1,2} Claude Pariset,¹ Sylvie Lécolle,¹ Jocelyn Côté,³ Christophe Chanoine,¹ and Frédéric Charbonnier¹

¹Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saints-Pères, Laboratoire de Neurobiologie des Réseaux Sensorimoteurs, Unité Mixte de Recherche 7060, Centre National de la Recherche Scientifique, F-75270 Paris Cedex 06, France, ²Université d'Evry-Val-d'Essonne, F-91025 Evry, France, and ³Centre for Neuromuscular Disease and Department of Cellular and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Ottawa, Ottawa, Ontario K1H 8M5, Canada

Spinal muscular atrophy (SMA), a lethal neurodegenerative disease that occurs in childhood, is caused by the misexpression of the survival of motor neuron (SMN) protein in motor neurons. It is still unclear whether activating motor units in SMA corrects the delay in the postnatal maturation of the motor unit resulting in an enhanced neuroprotection. In the present work, we demonstrate that an adequate NMDA receptor activation in a type 2 SMA mouse model significantly accelerated motor unit postnatal maturation, counteracted apoptosis in the spinal cord, and induced a marked increase of SMN expression resulting from a modification of SMN2 gene transcription pattern. These beneficial effects were dependent on the level of NMDA receptor activation since a treatment with high doses of NMDA led to an acceleration of the motor unit maturation but favored the apoptotic process and decreased SMN expression. In addition, these results suggest that the NMDA-induced acceleration of motor unit postnatal maturation occurred independently of SMN. The NMDA receptor activating treatment strongly extended the life span in two different mouse models of severe SMA. The analysis of the intracellular signaling cascade that lay downstream the activated NMDA receptor revealed an unexpected reactivation of the CaMKII/AKT/CREB (cAMP response element-binding protein) pathway that induced an enhanced SMN expression. Therefore, pharmacological activation of spinal NMDA receptors could constitute a useful strategy for both increasing SMN expression and limiting motor neuron death in SMA spinal cord.

Introduction

Spinal muscular atrophy (SMA) is a very severe autosomal recessive disease in childhood for which no efficient therapy is currently available. SMA is characterized by a specific loss of spinal motor neurons leading to a severe muscular weakness and death when vital muscles are affected (Crawford and Pardo, 1996). SMA is caused by mutation of the survival of motor neuron 1 (*Smn1*) gene (Lefebvre et al., 1995) leading to a deficiency of the survival of motor neuron (SMN) protein expression. All patients

retain one or more copies of the *Smn2* gene, which modulates the disease severity by allowing a small amount of full-length SMN transcripts and stable SMN protein to be produced (Lorson and Androphy, 2000). Several recent reports indicate that a low level of SMN protein impairs the motor system postnatal development in mice (Biondi et al., 2008; Kariya et al., 2008; Kong et al., 2009) and in patients (Martínez-Hernández et al., 2009). Whether this delay in postnatal development is a leading factor in SMA pathophysiology is still a matter of debate. In this respect, modulating the activation of the signaling cascade triggered by the NMDA subtype of ionotropic glutamate receptors (NMDARs) could provide relevant elements for solving this controversy. Indeed, several studies based on NMDAR inhibition strategies pointed out the major role of NMDAR-mediated signaling in (1) triggering the activity-dependent postnatal maturation of motor neurons (MNs) (Kalb and Hockfield, 1992; Kalb, 1994) and (2) preventing apoptosis in developing neurons (Ikonomidou et al., 1999; Llado et al., 1999). Likewise, impairing NMDAR activity in type 2 SMA-like mice limits the exercise-induced acceleration of the motor unit maturation and partly prevents exercise-induced neuroprotection (Biondi et al., 2008). Surprisingly, the effects of a direct and specific activation of NMDAR on motor unit matu-

Received April 7, 2010; revised May 31, 2010; accepted June 16, 2010.

This work was supported by a fellowship from Ministère de la Recherche et de la Technologie (O.B., J.B.). J.C. is a Canada Research Chair (Tier 2) in RNA Metabolism funded through Canadian Institutes for Health Research Operating Grant MOP-86746. G.S. is the recipient of a postdoctoral fellowship from l'Association Française contre les Myopathies. We thank Hung Li for his fruitful collaboration for all the past years. We thank C. Legay for the kind gift of the MBI muscle cells and B. Lamotte d'Incamps for his help in installing the coculture system. We also thank V. Mouly and S. Lefebvre for the antibodies and C.-L. Gallien and P.-P. Vidal for their comments and advice.

*O.B. and J.B. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to Frédéric Charbonnier, Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saints-Pères, Laboratoire de Neurobiologie des Réseaux Sensorimoteurs, Unité Mixte de Recherche 7060, Centre National de la Recherche Scientifique, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France. E-mail: frederic.charbonnier@parisdescartes.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1764-10.2010

Copyright © 2010 the authors 0270-6474/10/3011288-12\$15.00/0

ration have never been investigated *in vivo*, even in wild-type mice.

Furthermore, the NMDAR signaling pathway could activate neuroprotective mechanisms and possibly enhance the SMN2 gene expression in SMA motor neurons. The precise intracellular signaling pathways triggered by NMDARs still remain unexplored in spinal motor neurons. Yet it can be speculated from data collected from granular and hippocampal cell cultures that the extracellular signal-regulated kinase (ERK) and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT kinase pathways might be activated downstream the receptor (Lee et al., 2005; Papadia and Hardingham, 2007). Interestingly, both pathways can in theory recruit the cAMP response element-binding protein (CREB), a powerful activator of neuron prosurvival transcription factor on the one hand (Hardingham et al., 2002; Lee et al., 2005; Papadia et al., 2005) and an efficient transactivator of the *Smn* gene *in vitro* on the other (Majumder et al., 2004). Moreover, it is well known that the activation of the NMDAR results in an increase in the mouse *Smn* gene expression in wild-type neuron cultures (Andreassi et al., 2002).

The present study provides the first experimental lines of evidence indicating that an adequate activation of NMDAR in several SMA-like mice can delay cellular symptom progression, accelerating the motor unit postnatal maturation, limiting the apoptotic process, and enhancing SMN expression in SMA spinal cord.

Materials and Methods

Mice and treatments. The knock-out transgenic type 2 SMA-like mice (*Smn*^{Δ7/Δ7}, *SMN2*^{+/+}) derive from mice obtained from the Institute of Molecular Biology (Hsieh-Li et al., 2000) (Academia Sinica, Taipei, Taiwan). To standardize the type 2 phenotype, male and female mutant mice with a weight ranging from 3 to 4 g at 8 d of age were used for this study as previously described (Biondi et al., 2008). A vehicle-treated group (*n* = 64) and a NMDA-treated group (*n* = 109) of type 2 SMA-like mice were randomly constituted in a blind systematic manner to minimize bias. The control mice were heterozygous knock-out for *Smn* with the human *SMN2* transgene (*Smn*^{+/-Δ7}, *SMN2*^{+/+}; *n* = 70). The type 1 SMA-like mice containing two human *SMN2* transgenes and the mouse *Smn* knock-out were purchased from the The Jackson Laboratory and genotyped as previously described (Monani et al., 2000). Mouse genotypes were as follows: type 1 SMA-like mice (*Smn*^{-/-}, *SMN2*^{+/+}) (*n* = 58) and controls (*Smn*^{+/-}, *SMN2*^{+/+}) (*n* = 29).

To evaluate the benefits of NMDAR activation on SMA, postnatal day 8 (P8) neonatal control and type 2 SMA-like mice, and P1 neonatal control and type 1 SMA-like mice, were injected intrathecally with either 5 (referred as low dose) or 25 (referred as toxic dose) pmol of NMDA (100 μM) (Sigma-Aldrich) in 0.5 μl/g of 0.9% NaCl dyed in Evans blue per gram. These mice were compared, control and SMA-like mice injected from P8 or P1 with 0.5 μl/g of 0.9% NaCl dyed in Evans blue. Body weight and life span recordings were performed every day until the death of the animal. The animals were considered to be dead when mice were no longer able to stand up 20 s after having been placed on their sides. For the cellular studies, NMDA-treated and vehicle type 2 SMA-like mice were compared at P12, whereas P2 vehicle type 1 SMA-like mice were compared with P6 NMDA-treated type 1 SMA-like mice, to deal with the very short life span of vehicle type 1 SMA-like mice (~2 d) and the need for an appropriate duration of the NMDA treatment to be able to analyze its effects. Spinal cord of mice was systematically removed and assayed for the Evans blue staining within the spinal cord (supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

The care and treatment of animals followed the national authority (Ministère de la Recherche et de la Technologie, France) guidelines for the detention, use, and the ethical treatment of laboratory animals. The *in vivo* NMDA injection was approved by the local ethic committee (number P2.CC.034.07).

Cell cultures and treatments. Cocultures of spinal cord explants (1 mm³) and muscle cells were performed as described by Kobayashi et al. (1987) with the following modifications. Spinal cord explants were obtained from control and severe SMA embryonic mice. Explants from the whole transverse slices of 10.5-d-old mice embryo spinal cords including dorsal root ganglia (DRGs) were placed on the muscle monolayer. DRGs are essential to ensure a good innervation ratio (Kobayashi et al., 1987). The muscle culture was established through the differentiation of the wild-type muscle cell line made MBI (Cartaud et al., 2004). Myoblast cells were cultured on 35 mm Petri dish at 33°C in 8.5% CO₂ in DMEM supplemented with 2 mM glutamine, 20% horse serum, 10% fetal bovine serum, 2% penicillin/streptomycin (5000 U), and 20 U/ml γ-interferon (Roche Diagnostics). All the culture medium reagents were purchased from Invitrogen. Confluent myoblasts were differentiated into myotubes in the same medium without interferon [differentiation medium (DM)]. After 5–7 d in DM, spinal cord explants were added on the cultured contracting muscle cells. After coculture with spinal cord, the culture was kept in DM. All cocultures were fed three times a week and examined daily by phase-contrast inverted microscopy to check the appearance of the innervation. The presence of neuromuscular junctions (NMJs) was detected with Alexa Fluor 568-conjugated α-bungarotoxin and the axonal growth was observed through immunodetection using an anti-neurofilament and anti-synaptophysin primary antibodies as described below.

Stimulation of the NMDARs was achieved by exposing cells to 100 μM NMDA. Specific blockade of synaptic NMDARs was achieved using 10 μM (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[*a,d*]cyclohept-5,10-imine maleate (MK801) (Sigma-Aldrich) in Mg²⁺-free medium, followed by a thorough 1 mM MgCl₂ wash to fully remove MK801. To evaluate the Ca²⁺ dependency, extracellular Ca²⁺ chelator EGTA (5 μM) (Sigma-Aldrich) and cell-permeable Ca²⁺ chelator BAPTA-AM (10 μM) (Invitrogen) were added to the culture. The role of key signaling enzymes was achieved by the treatment of cocultures by specific inhibitor, the CaMKII inhibitor *N*-[2-[*N*-(4-chlorocinnamyl)-*N*-methylaminomethyl]phenyl]-*N*-(2-hydroxyethyl)-4-methoxybenzenesulfonamide phosphate salt (KN-93) (10 μM) (Calbiochem), the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ERK kinase (MEK) inhibitor 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadiene (U0126) (10 μM) (Promega), and the PI3K inhibitor 2-morpholin-4-yl-8-phenylchromen-4-one (LY294002) (100 μM) (Calbiochem).

After 5 d of treatment, explants were mechanically removed from the muscle layer, and proteins were purified and analyzed by Western blot as described below. The absence of muscle cell contamination in the explant fraction was checked by probing the Western blot with a myogenin antibody (1:500; Santa Cruz Biotechnology) and a tropomyosin I antibody (1:5000; Santa Cruz Biotechnology) (supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

Behavioral testing in NMDA-treated type 2 SMA-like mice. The grip strength was performed in the forelimb of control mice and vehicle- and NMDA-treated type 2 SMA-like mice from P8 to death. All the tests were made blind, the group assignment being unknown to the observers. The time spent holding onto a thin metal rod suspended in midair was calculated. Each mouse was subjected to five successive attempts separated by a 10 min rest period.

The ambulatory behavior was assessed in an open-field test for all groups. The apparatus consisted of a wooden box measuring 28 × 28 × 5 cm. The floor of the arena was divided into 16 × 7 cm squares. The squares that were immediately adjacent to the walls were referred to as periphery, and the four remaining squares were referred to as center. The mice were tested individually, and the open field was washed after each session. Each mouse initially placed in the center of the open field was allowed to move freely for 5 min. The behavioral measures recorded manually by the experimenter during these 5 min were the number of peripheral and central square crossings.

Histological and immunohistochemical analysis. Anesthetized animals were submitted to an intracardial perfusion of 40 ml of PBS solution at 1.2 ml · min⁻¹ followed by 40 ml of 4% PFA solution diluted in PBS solution at the same flow. Then spinal cords were dissected and incubated overnight in 4% PFA solution and washed twice for 2 h with PBS.

The lumbar spinal cords (L1 to L5) were embedded in 4% agarose solution in sterilized water for 30 min at 4°C. Fifty micrometer sections were then performed using a vibratome on the whole length of the sample. One of every five sections (an average of 30 sections examined corresponding to ~600 MNs per animal and ~5000 MNs per experimental point) was processed for immunohistochemical analysis. Tissue sections were incubated for 1 h at room temperature in a blocking solution [7% normal donkey serum with 0.5% Triton X-100 in Tris-buffered solution (TBS)]. Motor neuron immunodetection was performed using a choline acetyltransferase (ChAT) primary antibody (polyclonal goat anti-ChAT; 1:200; Millipore Bioscience Research Reagents) for 2 d at 4°C. Sections were washed between each subsequent step with 0.5% Triton X-100 in TBS. Sections were subsequently incubated with an Alexa Fluor 568 donkey anti-goat Ig (1:400; Jackson ImmunoResearch) for 1 h at room temperature. The sections were washed three times for 10 min in TBS and mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories). The staining specificity was checked in control incubations performed in the absence of the primary antibody.

For motor endplate labeling, whole-mount preparations of muscle fibers (~200 NMJs per muscle and per animal; ~1000 NMJs per experimental point) or cocultures were stained using Alexa Fluor 568-conjugated α -bungarotoxin (4 mg/ml in PBS with 4% bovine serum albumin). Presynaptic motor nerve terminals were stained with monoclonal rabbit antibodies directed against the 145 kDa isoform of neurofilament light protein (NN18; 1:500; Millipore Bioscience Research Reagents) and synaptophysin (1:5; Invitrogen). The whole-mount preparations were subsequently incubated with an Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:400; Invitrogen) for 1 h at room temperature.

For muscle typology, cryostat sections (one transversal medial section per muscle and per animal, which represented ~4000, 6000, and 12,000 muscle fibers in the soleus, the plantaris, and the tibialis, respectively, for each experimental point) were incubated with mouse monoclonal antibodies raised against myosin heavy chains (MyHCs) (1) embryonic (F1.652; University of Iowa, Iowa City, IA) and (2) neonatal MHC isoforms (N3.36; University of Iowa) at a dilution of 1:20 for 1 h at room temperature and washed three times in PBST (PBS containing 0.1% Tween 20). Sections were then incubated at room temperature with a rabbit anti-mouse Ig conjugated with FITC (1:20; Sigma-Aldrich) for 1 h. After washing with PBS, sections were mounted in Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories).

All counts were performed using NIH ImageJ software, version 1.37. Color images were tinted using Image Pro-Plus software, in which identical brightness, contrast, and color balance adjustments were applied to all groups.

Microscopy. All immunofluorescence images were collected with a CCD camera (QImaging Retiga 2000R Fast; Cooled Mono 12 bit) mounted on Olympus microscope (BX51) using the Image Pro-Plus, version 6.0, software (Media Cybernetics) with 40 \times (4 \times Olympus ob-

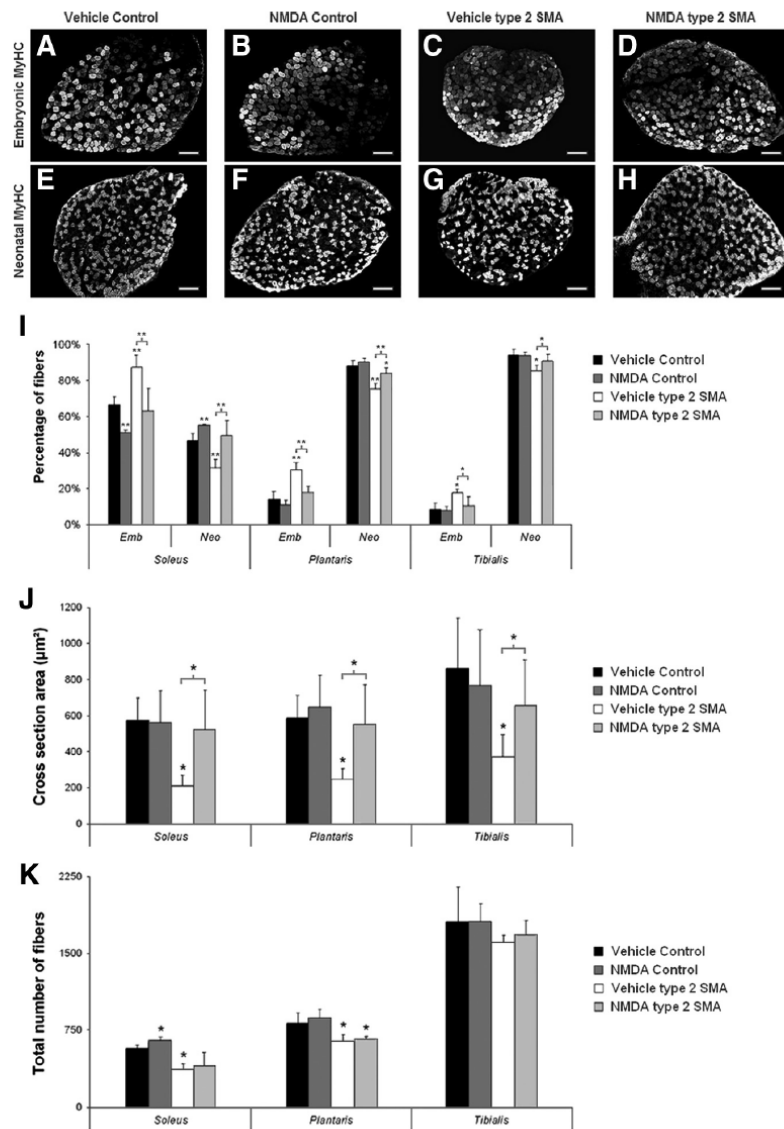


Figure 1. Effect of NMDA treatment on the muscle phenotype of type 2 SMA-like mice. **A–H**, Immunodetection of developmental MyHC isoforms (i.e., embryonic and neonatal) in the soleus of vehicle (**A**, **E**)- and NMDA-treated control mice (**B**, **F**) and vehicle (**C**, **G**)- and NMDA-treated type 2 SMA-like mice (**D**, **H**) at 12 d of age. Scale bar, 200 μm . **I**, Analysis of the embryonic (Emb) and neonatal (Neo) typology of three muscles of the calf (i.e., the soleus, the plantaris, and the tibialis muscles) from vehicle- and NMDA-treated control mice and type 2 SMA-like mice ($n = 6$), at 12 d of age. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. **J**, Determination of the cross-section area (CSA) of the soleus, the plantaris, and the tibialis from vehicle- and NMDA-treated control and type 2 SMA-like mice ($n = 6$) at 12 d of age. **K**, Number of muscle fibers in the soleus, plantaris, and tibialis muscles from vehicle- and NMDA-treated control and type 2 SMA-like mice ($n = 6$) at 12 d of age. Error bars indicate SD.

jective UPlan FL N 0.13), 100 (10 \times Olympus objective UPlan FL N 0.3), 200 (20 \times Olympus objective UPlan FL N 0.5), 400 (40 \times Olympus objective UPlan FL N 0.75), 600 (60 \times Olympus objective UPlanS Apo 1.35 oil), and 1000 (100 \times Olympus objective UPlanS Apo 1.4 oil) magnifications.

Protein and Western blot analysis. Ventral lumbar spinal cord samples (4–10 mg) were homogenized in 100 μl /5 mg tissues of ice-cold RIPA buffer [50 mM Tris HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 5 mM EDTA, pH 8.0, 2 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) (Sigma-Aldrich), 50 μg /ml leupeptin, 50 μg /ml pepstatin A, and 50 μg /ml aprotinin]. Protein concentration of the clarified homogenates (4°C, 15 min, 13,500 rev \cdot min $^{-1}$) was determined on all samples using the Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories). Ten

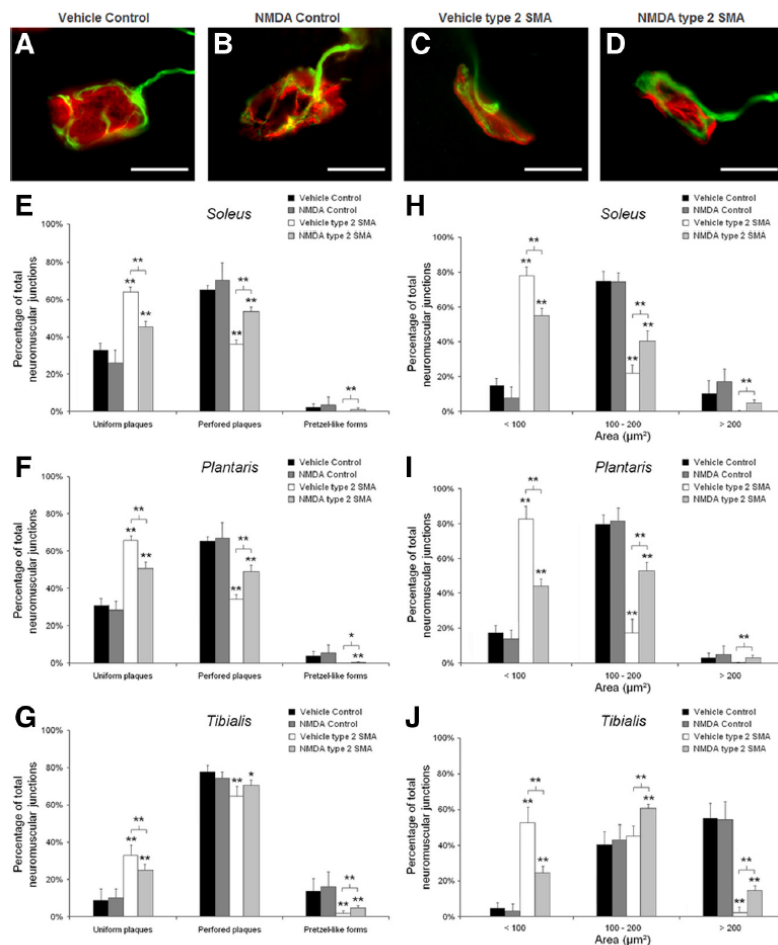


Figure 2. Effect of NMDA treatment on neuromuscular junction maturation in type 2 SMA-like mice. *A–D*, Motor endplate labeling with α -bungarotoxin, anti-neurofilament, and anti-synaptophysin antibodies in the soleus of vehicle (*A*) and NMDA-treated control mice (*B*) and vehicle (*C*) and NMDA-treated type 2 SMA-like mice (*D*) at 12 d of age showing a typical pretzel (*B*), perforated (*A*, *D*), and immature (*C*) type of NMJ. Scale bar, 20 μ m. *E–G*, Analysis of the neuromuscular junction maturation in the soleus, the plantaris, and the tibialis muscles from vehicle- and NMDA-treated control and type 2 SMA-like mice ($n = 5$) at 12 d of age. *H–J*, Determination of the neuromuscular junction area in the soleus, plantaris, and tibialis from vehicle- and NMDA-treated control and type 2 SMA-like mice ($n = 5$) at 12 d of age. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Error bars indicate SD.

microgram protein samples for SMN analysis and 30 μ g samples for other analysis of each homogenate were submitted to 12.5% SDS-PAGE electrophoresis [1.5 M Tris, pH 8.3, 12.5% acrylamide, 0.07% Bis, 0.1% SDS, 0.05% APS (ammonium persulfate), 0.06% TEMED (tetramethylethylenediamine)]. The separated proteins were transferred on PVDF (polyvinylidene difluoride) membranes (Bio-Rad Laboratories) according to Towbin et al. (1984). Equal loading of samples was checked by Ponceau dye staining of the transferred gels. Western blot analysis was performed on membranes overnight at 4°C in 4% BSA, 0.05% Tween 20, pH 7.4. Each of the following primary antibodies, including monoclonal mouse anti-SMN (1:5000; Santa Cruz Biotechnology), polyclonal rabbit anti-Ser⁴⁷³ phospho-AKT (1:1000; Cell Signaling Technology), polyclonal rabbit anti-phospho-ERK1/2 (1:500; Cell Signaling), polyclonal rabbit anti-Ser¹³³ phospho-CREB (1:1000; Millipore), polyclonal rabbit anti-myogenin (1:500; Santa Cruz Biotechnology), polyclonal rabbit anti-tropomyosin (1:5000; Santa Cruz Biotechnology), and polyclonal rabbit anti-caspase 3 (1:1000; Cell Signaling) was incubated overnight at 4°C in the above blocking medium. Membranes were rinsed in 0.1% Tween 20 in TBS three times for 10 min each time at room temperature and then incubated in horseradish peroxidase-conjugated goat secondary antibody

directed against mouse Igs (1:5000; Bio-Rad Laboratories) and in horseradish peroxidase-conjugated goat secondary antibody directed against rabbit Igs (1:10,000; Jackson ImmunoResearch) in 0.1% Tween 20 in TBS for 1 h at room temperature. Bound antibody complexes were developed using the ECL system (GE Healthcare) and exposed to Hyperfilm ECL-plus x-ray film (GE Healthcare).

In some instances, membranes were stripped after immunoblotting with phospho-AKT, phospho-ERK, and phospho-CREB by incubation in stripping buffer (100 mM β -mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7) for 30 min at 55°C with agitation, and membranes were then blocked and reprobed with polyclonal rabbit anti-AKT (1:1000; Cell Signaling), polyclonal rabbit anti-ERK1/2 (1:500; Cell Signaling), polyclonal rabbit anti-CREB (1:1000; Millipore), monoclonal mouse anti-GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) antibody (1:5000; Millipore Bioscience Research Reagents).

Films were quantified with NIH ImageJ, version 1.37, and the results reported as means \pm SD.

Real-time reverse transcription-PCR analysis. Spinal cord samples were grinded using an Alloy Tool Steel Mortar (Thermo Fisher Scientific) and RNA was extracted using Trizol (Invitrogen) and 1 μ l of Glycoblue (Ambion) as a carrier. Each RNA preparation was treated with DNase I (DNAfree; Ambion). Reverse transcription (RT) was performed using AMV Reverse Transcriptase (Promega) and random primers (Invitrogen). PCR was performed using GoTaq (Promega) and qPCR was performed using IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) on a Chromo4 real-time PCR machine (Bio-Rad). The relative amounts of cDNA in samples were determined on the basis of the threshold cycle for each PCR product (Ct) and were normalized to 18S RNA levels.

Sequences of primer sets used for amplification were as follows: SMN2 exon 4–exon 5 segment: E4E5, forward, 5'-TGTTGTGGTT-TACTACTGG-3', and E4E5, reverse, 5'-TATT-TCCAGGAGACCTGGAG-3'; SMN2 exon 6–exon 8 segment: E6E8, forward, 5'-GAT-GCTGATGCTTTGGGAAG-3', and E6E8, reverse, 5'-GCCTCACCACCGTGCTGG-3'; SMN2 exon 7–exon 8 segment: E7E8, forward, 5'-AAAAAGAAGGAAGGTGCTCAC-3', and E6E8, reverse, 5'-GCCTCACCACCGTGCTGG-3'; 18S, forward, 5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3', and 18S, reverse, 5'-CCAT-CCAATCGGTAGTAGCG-3'.

Statistical analysis. All values are displayed as means and SD within each group (Systat, version 8.0; SPSS). Statistical analysis was performed and comparison between groups were done using ANOVA and *post hoc* test least significant difference. Survival analysis was performed using Kaplan–Meier analysis.

Results

The NMDA treatment accelerates skeletal muscle maturation

We evaluated the effects of NMDAR activation on the neuromuscular maturation schedule in control and type 2 SMA-like mice. Mice were treated daily by intrathecal injection of NMDA (5 pmol \cdot g⁻¹) from 8 d of age. The progressive acquisition of the adult phenotype by the skeletal muscle was used as a quantitative

index of the neuromuscular postnatal maturation. Therefore, we analyzed the muscle phenotype of three skeletal muscles including two extensors, the slow-twitch soleus and the fast-twitch plantaris, and one flexor, the fast-twitch tibialis, from control and type 2 SMA-like at 12 d of age (Fig. 1). The NMDA treatment resulted in a remarkable acceleration of muscle postnatal maturation in SMA-like mice, as evidenced by the NMDA-induced promotion of embryonic to neonatal phenotype shift (Fig. 1*I*). This phenomenon occurred regardless of both the muscle phenotype (slow-twitch vs fast-twitch) and the muscle function (extensor vs flexor). It should be emphasized that an acceleration of muscle maturation was also observed in control soleus muscles after the NMDA treatment.

Previous experiments in our laboratory have shown that the SMA skeletal muscles display severe atrophy and hypoplasia (Biondi et al., 2008). The present investigation showed that the NMDAR activation limited SMA-induced muscle atrophy, leading to an increase of 248, 222, and 177% in the fiber cross-section area of the soleus, plantaris, and tibialis, respectively, compared with vehicle-treated SMA-like mice ($p < 0.05$) (Fig. 1*J*). In contrast, no change in the total number of muscle fibers could be detected (Fig. 1*K*).

The NMDA treatment accelerates neuromuscular junction maturation

To ensure an accurate description of the motor unit developmental pattern in NMDA-treated versus type 2 SMA-like mice, we have analyzed the structure of the NMJs at 12 d of age (Fig. 2). During the motor unit postnatal maturation, the postsynaptic organization of the NMJ progressively changes from an immature small uniform plaque of acetylcholine receptors (AChRs) to a perforated large plaque of AChRs that eventually adopts a pretzel form. The changes in the synapse shape were determined for innervated NMJ using α -bungarotoxin staining of the three muscles, as previously described (Biondi et al., 2008). Up to 63% of the NMJs were elliptical, made of uniform plaques of AChRs in the two extensor muscles of the vehicle-treated type 2 SMA-like mice at 12 d of age. Only 28% of immature NMJs were found in control muscles ($p < 0.01$), regardless of muscle fiber phenotype. The NMDA treatment improved the NMJ morphology in the three muscles in type 2 SMA-like mice, as demonstrated by the NMDA-induced perforation (Fig. 2*E–G*) and enlargement (Fig. 2*H–J*) of the NMJs on the muscle fibers.

The NMDA treatment protects motor neurons in type 2 SMA-like mice

Since the NMDA treatment likely accelerated the skeletal muscle maturation, we questioned whether this effect could be beneficial in protecting motor neurons from cell death. Thus, we compared the number of ChAT-positive motor neurons in the ventral spinal cord of control mice and of vehicle- and NMDA-treated

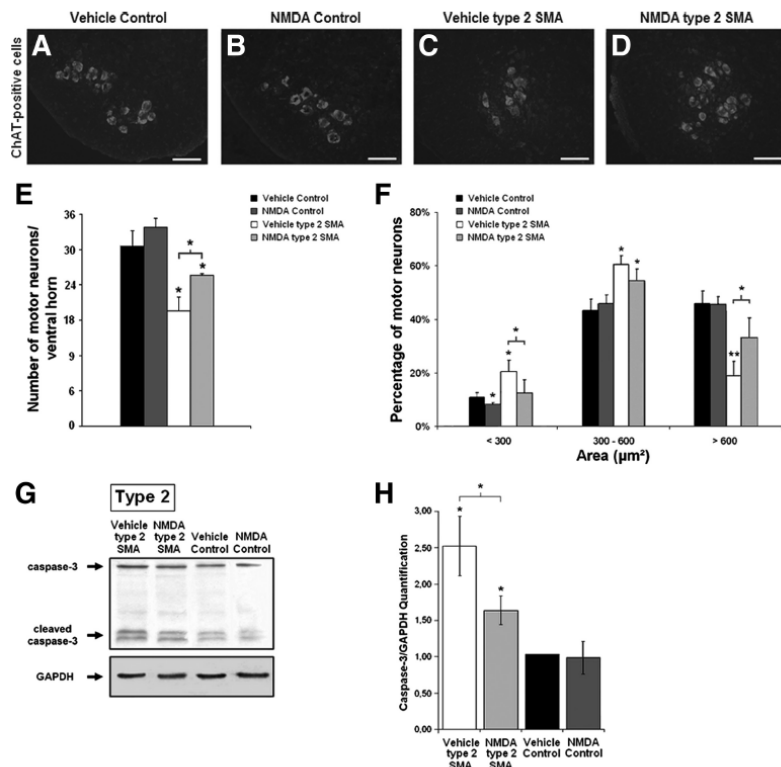


Figure 3. Neuroprotective effect of NMDA in type 2 SMA-like mice. *A–D*, Immunodetection of ChAT-positive motor neurons in the lumbar spinal cord (L1–L5) of vehicle (*A*)- and NMDA-treated control mice (*B*), and vehicle (*C*)- and NMDA-treated type 2 SMA-like mice (*D*) at 12 d of age. Scale bar, 100 μm . *E, F*, Quantitative analysis of the number (*E*) and the cell body area (*F*) of motor neurons per ventral horn in the lumbar spinal cord of vehicle-treated control and type 2 SMA-like mice ($n = 6$) at 12 d of age. *G, H*, Western blot analysis and quantification of cleaved caspase 3 protein expression in the ventral lumbar spinal cord of vehicle- and NMDA-treated control and type 2 SMA-like mice at 12 d of age ($n = 3$). $*p < 0.05$; $**p < 0.01$. Error bars indicate SD.

SMA-like mice (Fig. 3). At 12 d of age, a 33% loss of motor neurons was observed in the vehicle-treated type 2 SMA-like mice compared with untreated controls (Fig. 3*E*). In contrast, NMDA-treated type 2 SMA-like mice only showed a 18% reduction in the number of motor neurons, therefore demonstrating that the NMDA treatment significantly limited the extent of motor neuron death ($p < 0.05$). Furthermore, motor neuron cell body area evaluation provided evidence for a persistent atrophy of motor neurons in the ventral horn of the spinal cord of the vehicle-treated type 2 SMA-like mice compared with control mice at 12 d of age (Fig. 3*F*). In contrast, the extent of atrophy is significantly limited in NMDA-treated mice ($p < 0.05$). No difference could be observed in the number of motor neurons in NMDA- and vehicle-treated control mice at the same age.

To determine whether the NMDA treatment interfered with the apoptotic process in the spinal cord of SMA-like mice, we evaluated the activation of the caspase 3 in the ventral spinal cord of control mice and of vehicle- and NMDA-treated SMA-like mice (Fig. 3*G, H*). As shown in these figures, the NMDA treatment limited the range of the apoptotic process in SMA-like mouse spinal cord.

The NMDA treatment improves the motor behavior and prolongs survival of type 2 SMA-like mice

We then questioned whether the cellular benefits of the NMDA treatment would improve the motor behavior of the treated mice.

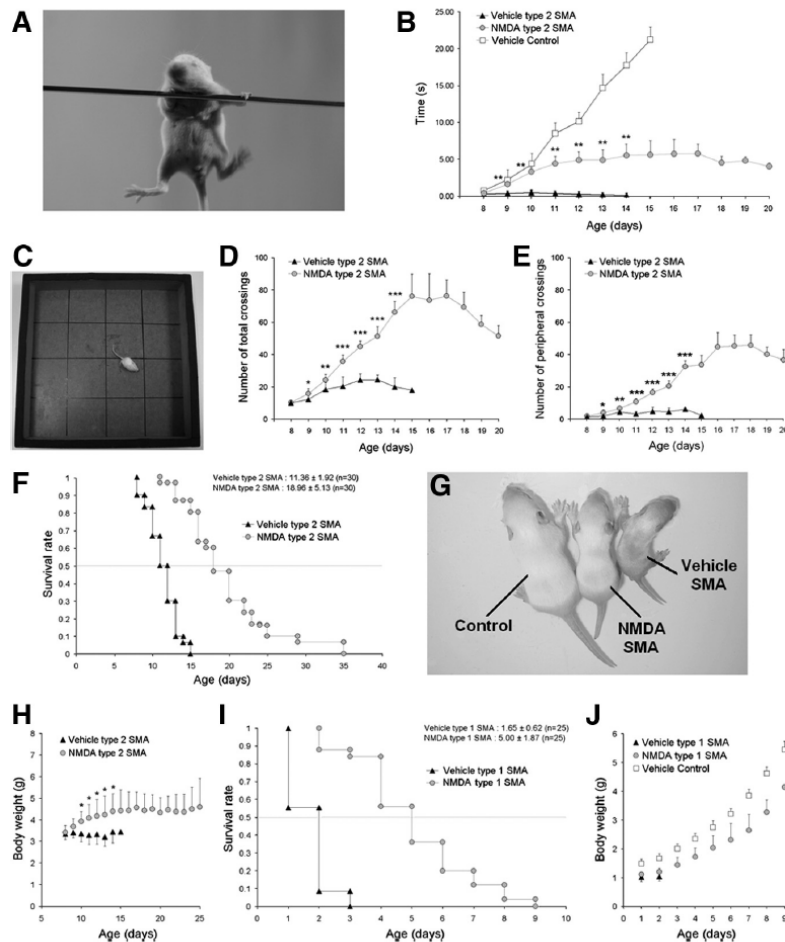


Figure 4. Effect of NMDA on muscle function, life span, and weight gain in SMA-like mice. *A*, Picture showing NMDA-treated type 2 SMA-like mice during a grip test on a metal rod at 12 d of age. *B*, Grip time of vehicle-, and NMDA-treated type 2 SMA-like mice compared with vehicle-treated controls ($n = 13$, $n = 11$, and $n = 15$, respectively). *C*, Behavior of NMDA-treated type 2 SMA-like mice during an open field test at 12 d of age. *D*, Total number of crossings during 5 min for the NMDA-treated ($n = 13$) compared with vehicle-treated type 2 SMA-like mice ($n = 11$). *E*, Number of peripheral crossings for the NMDA-treated mice compared with the vehicle-treated mice. *F*, Life span of NMDA-treated ($n = 30$) compared with vehicle-treated type 2 SMA-like mice ($n = 30$). *G*, Phenotype of control mice (Control) compared with vehicle-treated type 2 SMA-like mice (Vehicle SMA) and NMDA-treated type 2 SMA-like mice (NMDA SMA) at 12 d of age. *H*, Weight curve in NMDA-treated ($n = 20$) compared with vehicle-treated type 2 SMA-like mice ($n = 20$). *I*, Life span of NMDA-treated ($n = 25$) compared with vehicle-treated type 1 SMA-like mice ($n = 25$). *J*, Weight curve in NMDA-treated ($n = 15$) compared with vehicle-treated type 1 SMA-like mice ($n = 15$) and vehicle-treated control ($n = 15$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Error bars indicate SD.

We first subjected the mice to a grip test and found that the vehicle-treated SMA-like mice were unable to efficiently grip the metal rod, at any age (Fig. 4*A,B*). In contrast, the grip time of the NMDA-treated type 2 SMA-like mice progressively increased to 5 ± 0.2 s until 17 d of age, but remained lower compared with the vehicle-treated control mice. We then compared the spontaneous activity of the mice in an open field (Fig. 4*C–E*). After 10 d of age, vehicle-treated SMA-like mice displayed a strongly reduced exploratory activity compared with age-matched controls, with a limited increase in the total number of crossings (18–24 crossings between 10 and 12 d of age, respectively; $p < 0.05$) and no increase in the number of peripheral crossings ($p > 0.05$). In contrast, the NMDA-treated SMA-like mice displayed a significant increase in the total number of cross-

ings between 10 and 12 d of age ($p < 0.01$). Interestingly, the NMDAR activation induced a progression in exploratory activity of SMA-like mice with an increase in the total number of peripheral crossings during growth and until 17 d of age (from 6 to 43 crossings at 10 and 17 d of age, respectively; $p < 0.001$).

The impact of the NMDAR activation on the life span of type 2 SMA-like mice was then evaluated. The NMDA treatment significantly increased survival of type 2 SMA-like mice compared with vehicle-treated SMA-like mice (Fig. 4*F*). The mean survival increased from 11.36 ± 1.92 d for the vehicle-treated mice to 18.96 ± 5.13 d for the NMDA-treated mice, representing a 66.9% increase in life span ($p < 0.001$). The type 2 SMA-like mice typically displayed a severe body weight reduction. The NMDA treatment led to a significant and progressive increase in the body weight of SMA-like mice, until 4 or 5 d before death (Fig. 4*H*).

The NMDA treatment is strongly beneficial for the severe type 1 SMA-like mouse model

To evaluate the therapeutic relevance of the NMDAR activation in SMA, we investigated the effects of the NMDA treatment in another mouse model of SMA, namely the type 1 SMA-like model developed by Monani et al. (2000). A population of 25 type 1 SMA-like mice was treated daily by intrathecal injection of NMDA ($5 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1}$) from 1 d of age and compared with a control population of 25 mutant mice treated with vehicle (NaCl, 0.9%) from 1 d of age. The NMDA treatment significantly extended the type 1 SMA-like mouse life span that increased from 1.65 ± 0.62 to 5 ± 1.87 d, representing a threefold gain of life span ($p < 0.001$) (Fig. 4*I*). In addition, during the treatment, SMA-like mice regularly gained weight until death (Fig. 4*J*).

In vivo NMDA treatment enhances SMN protein expression in the spinal cord of SMA-like mice

Since the cause and the severity of SMA are both related to the expression level of SMN, we analyzed the impact of NMDAR activation on the expression profile of SMN in the spinal cord of the two SMA mouse models. In both strains, the NMDA-induced increase in SMN protein concentration is clearly evidenced by the immunoblot analysis performed at the lumbar spinal cord level (Fig. 5). In type 1 SMA-like mice, a twofold increase in SMN expression level was observed in NMDA-treated mutant mice compared with vehicle-treated SMA-like mice, although this level was lower compared with wild-type controls (Fig. 5*A,B*). The NMDA-mediated enhancement of SMN expression was also de-

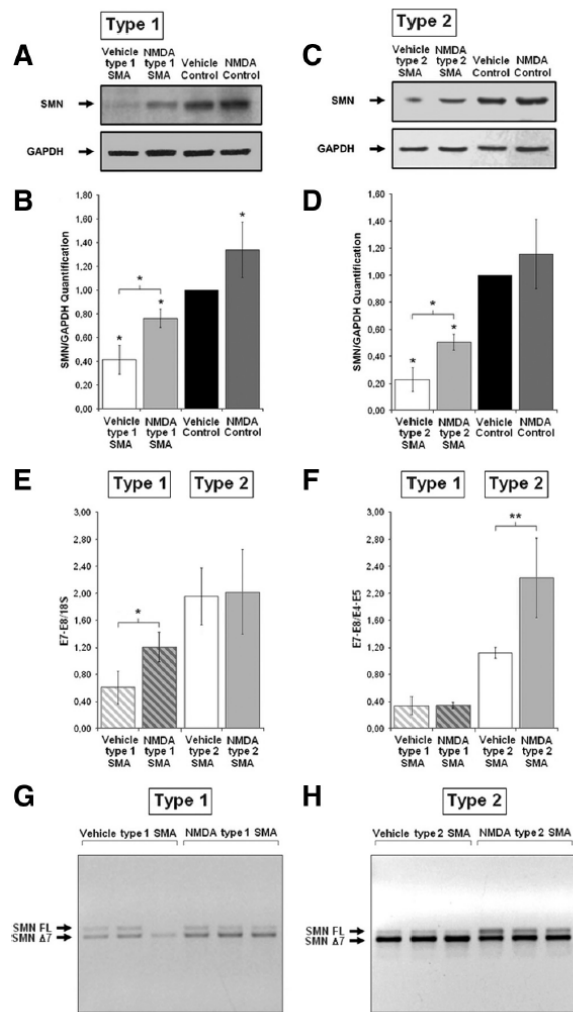


Figure 5. SMN expression in the spinal cord of vehicle- and NMDA-treated SMA-like mice. *A*, *B*, Western blot analysis and quantification of SMN protein expression in the ventral lumbar spinal cord of control mice at 6 d of age, vehicle type 1 SMA-like mice at 2 d of age, and NMDA-treated type 1 SMA-like mice at 6 d of age ($n = 3$). *C*, *D*, Western blot analysis and quantification of SMN protein expression in the ventral lumbar spinal cord of control mice, vehicle- and NMDA-treated type 2 SMA-like mice at 12 d of age ($n = 4$). *E*, *F*, Quantification by real-time RT-PCR of exon 7–exon 8 (E7–E8) segment-containing SMN transcripts normalized to 18S transcripts in the ventral lumbar spinal cord of vehicle type 1 and type 2 SMA-like mice at 2 and 12 d of age, respectively, and of NMDA-treated type 1 and type 2 SMA-like mice at 6 and 12 d of age, respectively (*E*). Quantification by real-time RT-PCR of exon 7–exon 8 (E7–E8) segment-containing SMN transcripts normalized to exon 4–exon 5 (E4–E5) segment-containing SMN transcripts in the ventral lumbar spinal cord of vehicle type 1 and type 2 SMA-like mice at 2 and 12 d of age, respectively, and of NMDA-treated type 1 and type 2 SMA-like mice at 6 and 12 d of age, respectively (*F*). *G*, RT-PCR analysis of SMN full-length transcripts (SMN FL, 392 nt) and SMN transcripts lacking exon 7 (SMN Δ 7, 338 nt) in the ventral lumbar spinal cord of vehicle type 1 SMA-like mice at 2 d of age and NMDA-treated type 1 SMA-like mice at 6 d of age. *H*, RT-PCR analysis of SMN full-length transcripts (SMN FL, 392 nt) and SMN transcripts lacking exon 7 (SMN Δ 7, 338 nt) in the ventral lumbar spinal cord of vehicle- and NMDA-treated type 2 SMA-like mice at 12 d of age. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Error bars indicate SD.

tected in controls treated from P1 and analyzed at 6 d of age. In type 2 SMA-like mice, the NMDA-induced SMN expression corresponded to a twofold increase compared with vehicle-treated SMA-like mice, although this level was lower compared with wild-type

controls (Fig. 5*C,D*). No significant NMDA effect on SMN expression could be detected in controls treated from 8 d of age.

To determine whether the increased SMN protein level resulted from an activation of SMN2 gene expression and/or from a modulation of the exon 7 insertion in the SMN transcripts, we quantified the fraction of exon 7-containing mRNA inside the population of SMN transcripts using real-time RT-PCR aimed at amplifying either the exon 7–exon 8 segment (E7–E8) or the exon 4–exon 5 segment (E4–E5) in the ventral spinal cord of vehicle- and NMDA-treated type 1 and type 2 SMA-like mice (Fig. 5*E–H*). Unexpectedly, the NMDA treatment provided a differential effect depending on the SMA type. In type 1 SMA-like mice, the NMDAR activation induced a twofold increase in SMN2 gene expression. In contrast, this treatment had no detectable effect on exon 7 inclusion in SMN transcripts. Conversely, in type 2 SMA-like mice, the NMDA treatment, which had no detectable effect on SMN2 gene transcription, did increase the relative level of exon 7-containing SMN transcripts. These results were further confirmed by a classic RT-PCR approach aimed at amplifying the exon 6–exon 8 segment (E6–E8) (Fig. 5*G,H*).

The Ca^{2+} signaling is involved in NMDA-induced SMN expression in SMA spinal cord

To investigate the molecular pathways that lay downstream the NMDAR, we developed an *in vitro* protocol, based on the coculture of spinal cord explants from severe SMA and control embryos (E10.5) grown on a monolayer of contractile muscle fibers (muscle cell line MBI) (Cartaud et al., 2004). Approximately 150 neuromuscular junctions per explant could be seen after 20 d of culture in SMA and control preparations (Fig. 6*A,B*). The NMDA treatment of the cocultures induced a strong increase (fivefold) of SMN protein expression in the SMA explants, after 5 d of treatment by 100 μ M NMDA (Fig. 6*C,D*). To ascertain that the SMN protein increase was solely attributable to NMDAR activation, we treated the SMA explants with NMDA in presence of the NMDAR antagonist MK801 (10 μ M). Specific inhibition of NMDARs blocked the NMDA-mediated increase of SMN expression. The same effects were observed in control explants albeit to a lower range.

Because Ca^{2+} influx through NMDARs is important in downstream signaling after synaptic activity (Hardingham et al., 2001), we explored its role in NMDA-induced increase of SMN expression in control and SMA explants (Fig. 6*C,D*). Chelating extracellular Ca^{2+} by EGTA completely blocked the NMDA-induced activation of SMN protein expression in SMA explants. To evaluate more accurately the role of the Ca^{2+} influx through the NMDAR, we analyzed the effects of the cell-permeable Ca^{2+} chelator BAPTA-AM. The inhibition of the Ca^{2+} cell signal abolished the NMDA-induced increase of SMN expression. Similarly, in control explants, blocking the Ca^{2+} influx prevented the NMDA-mediated SMN increase of expression.

Since CaMKII, which is present at excitatory postsynaptic compartments, transduces Ca^{2+} signals generated by NMDARs (Fukunaga et al., 1992), we examined the involvement of CaMKII in the NMDA-induced increase in SMN expression in SMA spinal cords. We first analyzed the phosphorylation status of CaMKII in the spinal cord after *in vivo* NMDAR activation in type 1 (Fig. 6*E,F*) and type 2 SMA-like mice (Fig. 6*G,H*). The NMDA treatment induced a threefold and a twofold increase of the phosphorylated form of CaMKII in type 1 and type 2 SMA-like mice, respectively, compared with vehicle-treated SMA spinal cords. A NMDA-mediated increase of CaMKII phosphorylation was also

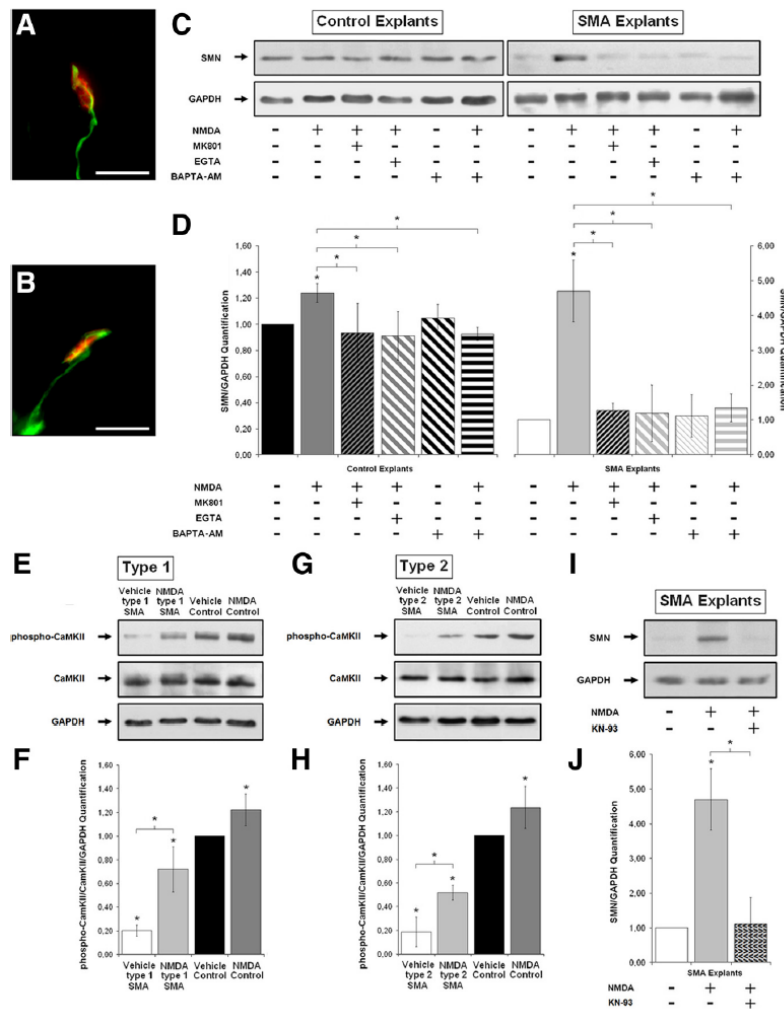


Figure 6. Evaluation of the role of the Ca^{2+} signaling in NMDA-induced SMN expression in SMA spinal cord and SMA explants. **A, B**, Labeling of neuromuscular junctions with α -bungarotoxin, anti-neurofilament, and anti-synaptophysin antibodies in control (**A**) and SMA (**B**) spinal cord explants showing similar structures. Scale bar, 20 μm . **C, D**, Western blot analysis and quantification of SMN protein expression in control and SMA spinal cord explants in presence or not of NMDA, MK801, and calcium chelators EGTA and BAPTA-AM ($n = 3$). **E, F**, Western blot analysis and quantification of CaMKII protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of control mice at 6 d of age, of vehicle type 1 SMA-like mice at 2 d of age, and NMDA-treated type 1 SMA-like mice at 6 d of age ($n = 3$). **G, H**, Western blot analysis and quantification of CaMKII protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of control mice, vehicle- and NMDA-treated type 2 SMA-like mice at 12 d of age ($n = 3$). **I, J**, Western blot analysis and quantification of SMN protein expression in SMA spinal cord explants in presence or not of NMDA and CaMKII inhibitor KN-93 ($n = 3$). * $p < 0.05$. Error bars indicate SD.

observed in control spinal cord. We next analyzed the effects of the specific inhibition of CaMKII activity by KN-93 (10 μM) in cocultures from SMA spinal cords. We found that inhibition of CaMKII blocked the NMDA-induced increase of SMN expression in SMA explants (Fig. 6I, J).

Ca^{2+} /calmodulin signaling is therefore an essential requirement for triggering NMDA-dependent SMN expression activation in SMA spinal cords.

The phosphatidylinositol 3-kinase–AKT pathway, but not the MAPK–ERK pathway, mediates SMN expression evoked by NMDAR activation in SMA spinal cord

Among the potential prosurvival pathways triggered by NMDAR activity, the PI3K–AKT kinase cascade is one of the most reported

signaling pathway in a number of neuronal cells (Brunet et al., 2001; Lafon-Cazal et al., 2002). In addition, PI3K can be activated in a Ca^{2+} -dependent manner by CaMKII (Sutton and Chandler, 2002). We then questioned whether the PI3K/AKT signaling pathway is involved in the NMDA-induced increase of SMN protein expression. We first analyzed the phosphorylation status of the AKT kinase, a key target of PI3K, implicated as the transducer of PI3K-dependent survival signals (Franke et al., 1997). Interestingly, the state of AKT phosphorylation was consistently lower in the spinal cord of type 1 (Fig. 7A, B) and type 2 (Fig. 7C, D) SMA-like mice, compared with control. The *in vivo* NMDA treatment of the spinal cord of type 1 and type 2 SMA-like mice increased the phosphorylation of AKT by more than twofold. Accordingly, the p-AKT/total AKT ratio increased after the NMDA treatment compared with vehicle-treated SMA-like mice, reflecting an increase in the activity level of AKT. Pretreatment of the cocultures with LY294002 (10 μM), a selective inhibitor of PI3K, completely blocked the NMDA-induced increase of SMN expression, thus demonstrating that NMDA-induced SMN expression in SMA spinal cord is PI3K/AKT dependent (Fig. 7E, F).

Since the MAPK–ERK pathway has also been implicated in the survival of neuronal cells (Xia et al., 1995; Hetman et al., 1999) and is a target for active CaMKII (Chandler et al., 2001), we examined whether the *in vivo* NMDA treatment led to ERK1/2 activation in the spinal cord of type 1 and type 2 SMA-like mice. Western blot analysis using both a phospho ($\text{Thr}^{202}/\text{Tyr}^{204}$)- and a dephospho-specific P44/42 MAPK antibody showed that NMDA treatment was unlikely to activate ERK in SMA spinal cords (Fig. 7G–J). Accordingly, pretreatment of the cocultures with the MEK inhibitor U0126 (10 μM), which significantly inhibited ERK1/2 activation, had no detectable effect on NMDA-induced SMN expression in SMA explants (Fig. 7K, L).

NMDA treatment stimulates CREB phosphorylation in SMA spinal cord

A key mediator of activity-dependent gene transcription is the transcription factor CREB, which binds to the cAMP response element (CRE) (Lonze and Ginty, 2002). CRE-dependent gene expression is strongly induced by synaptic NMDAR activity (Hardingham et al., 2002). Interestingly, several CRE sites have been identified in the *Snn* promoter (Monani et al., 1999), and CRE was shown to function as positive regulator of SMN expression *in vitro* (Majumder et al., 2004). Therefore, we tested whether *in vivo* and *in vitro* activation of NMDARs triggered

phosphorylation of CREB in type 1 and type 2 SMA-like mice and in coculture with SMA explants (Fig. 8). Immunoblotting with an antibody that specifically recognizes CREB phosphorylation at Ser¹³³ revealed that the NMDAR activation resulted in a more than twofold increase in CREB phosphorylation in type 1 (Fig. 8*A,B*) and type 2 (Fig. 8*C,D*) SMA-like mice compared with vehicle-treated SMA-like mice. NMDA-induced phosphorylation of CREB was inhibited when SMA explants were incubated with MK801, with the Ca²⁺ chelator BAPTA-AM, with the PI3K inhibitor LY294002, or with the CaMKII inhibitor KN-93, but not with the ERK inhibitor U0126 (Fig. 8*E,F*).

Discussion

As evidenced by the activity-dependent development of neurons within several regions of the nervous system (Crair and Malenka, 1995; Kirkwood and Bear, 1995), motor neurons undergo NMDAR-mediated molecular and morphologic development during the critical period of early postnatal life (Kalb and Hockfield, 1992; Kalb, 1994). We reported here that, in addition to its strictly neuronal effect, the NMDA-mediated acceleration of motor neuron development is directly involved in the whole motor unit development, including the promotion of the skeletal muscle maturation. These data are particularly relevant in the specific context of SMA, since accumulating data in patients (Martínez-Hernández et al., 2009) and in SMA mouse models (Biondi et al., 2008; Kariya et al., 2008; Kong et al., 2009) have revealed developmental defects with a particular impact of the postnatal maturation of the motor unit. Indeed, although no obvious difference in the development schedule was observed in the motor units of type 1 SMA-like mice at birth (McGovern et al., 2008), a significant delay was observed thereafter in the same strain (Kariya et al., 2008). A poor activity of the motor unit as seen in SMA might interfere with the postnatal maturation, worsening the effects of the lack of SMN. A treatment with a toxic dose of NMDA (25 pmol • g⁻¹) still accelerated motor unit postnatal maturation, but was unable to enhance SMN expression and to alleviate disease symptoms in type 2 SMA-like mice (supplemental Fig. 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). These results are likely attributable to the promotion of apoptotic pathways, as seen by analysis of the caspase 3 pattern of activation and to the inhibition of prosurvival pathways, as seen by the downregulation of AKT phosphorylation in the spinal cord of toxic NMDA dose-treated mice (supplemental Fig. 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Nevertheless, these results suggest that SMN is not directly involved the NMDA-induced promotion of motor unit development.

The present study reports for the first time that the *in vivo* and direct activation of the NMDARs can efficiently protect motor

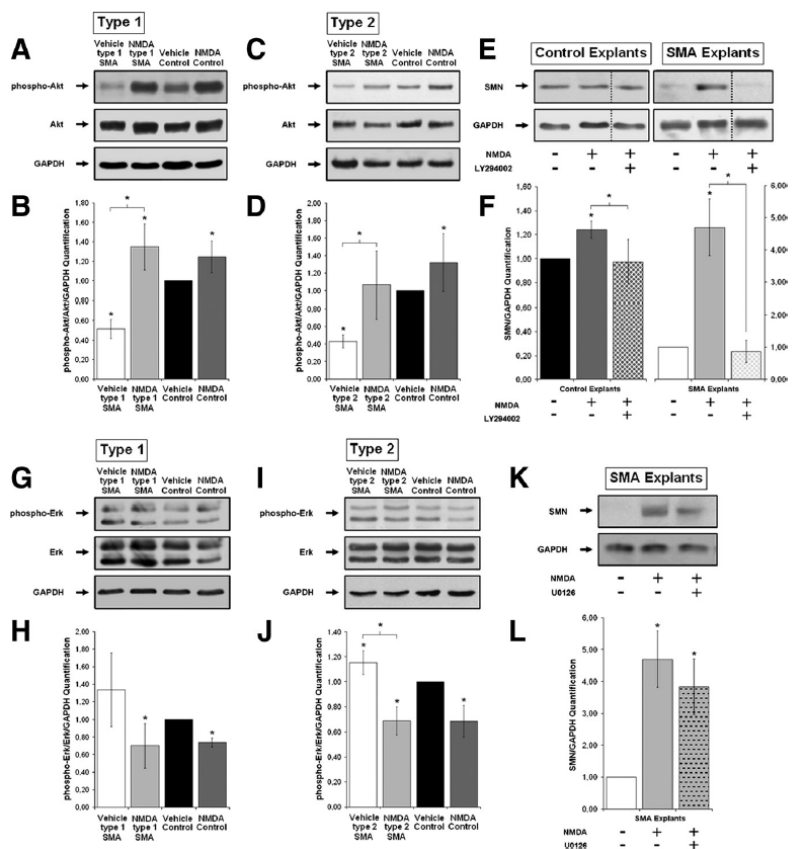


Figure 7. Evaluation of AKT and ERK phosphorylation in NMDA-induced SMN expression in SMA spinal cord and SMA explants. *A, B*, Western blot analysis and quantification of AKT protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of control mice at 6 d of age, of vehicle type 1 SMA-like mice at 2 d of age, and NMDA-treated type 1 SMA-like mice at 6 d of age ($n = 3$). *C, D*, Western blot analysis and quantification of AKT protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of control mice, vehicle- and NMDA-treated type 2 SMA-like mice at 12 d of age ($n = 3$). *E, F*, Western blot analysis and quantification of SMN protein expression in the control and SMA spinal cord explants in presence or not of NMDA and PI3K inhibitor LY294002 ($n = 3$). *G, H*, Western blot analysis and quantification of ERK protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of control mice at 6 d of age, of vehicle type 1 SMA-like mice at 2 d of age, and NMDA-treated type 1 SMA-like mice at 6 d of age ($n = 3$). *I, J*, Western blot analysis and quantification of ERK protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of control mice, vehicle- and NMDA-treated type 2 SMA-like mice at 12 d of age ($n = 3$). *K, L*, Western blot analysis and quantification of SMN protein expression in SMA spinal cord explants in presence or not of NMDA and ERK inhibitor U0126 ($n = 3$). * $p < 0.05$. Error bars indicate SD.

neurons from death in SMA mouse model spinal cord. These data are consistent with previous studies showing neuroprotective effects of low doses of NMDA in the embryonic brain and spinal cord (Kalb and Hockfield, 1992; Kalb, 1994; Ikonomidou et al., 1999, 2000; Hardingham and Bading, 2003). The NMDA-induced promotion of motor neuron survival in SMA spinal cord likely occurs through the activation of the predominantly anti-apoptotic PI3K/AKT pathway. Importantly, we have observed a decrease in the phosphorylated-active form of AKT and in one of its main target protein CREB in SMA spinal cord from both type 1 and type 2 SMA-like mice. Consequently, the beneficial effects of the NMDA treatment for SMA-like mice might be also related to an activation of the AKT/CREB prosurvival cascade, which likely counteracts the caspase cascade activation and the motor neuron death as found in the spinal cord of NMDA-treated type 2 SMA-like mice. This hypothesis is consistent with the fact that, under higher activation of the spinal NMDARs, the pattern of AKT activation was comparable with those of the vehicle SMA-like mice, and the neuroprotective potential of NMDAR activa-

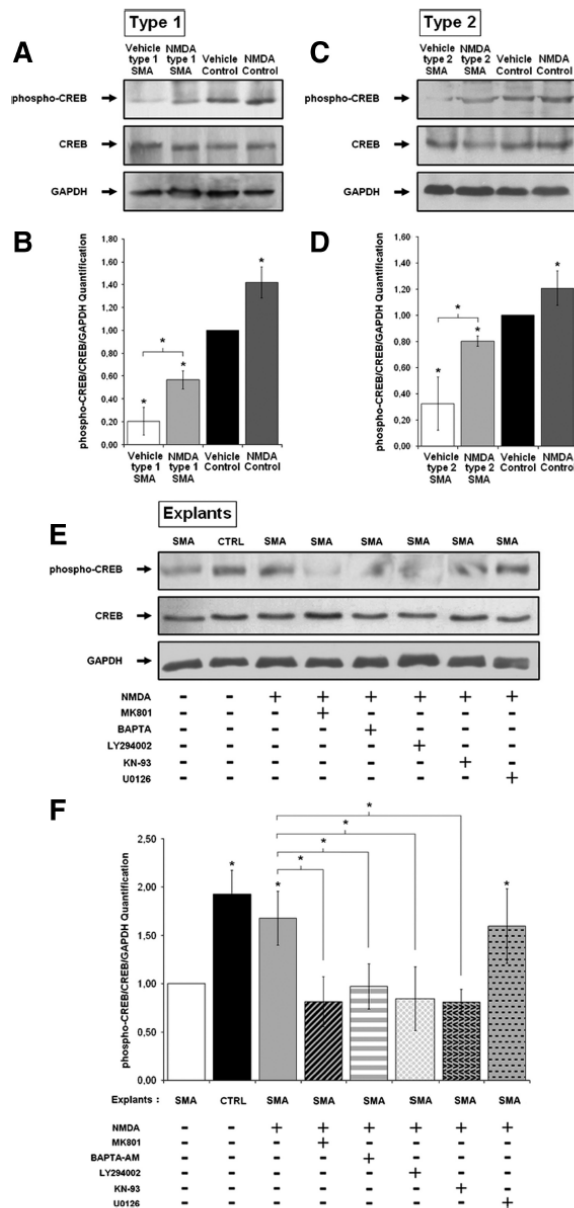


Figure 8. Evaluation of CREB phosphorylation in NMDA-induced SMN expression in SMA spinal cord and SMA explants. **A, B**, Western blot analysis and quantification of CREB protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of control mice at 6 d of age, of vehicle type 1 SMA-like mice at 2 d of age, and NMDA-treated type 1 SMA-like mice at 6 d of age ($n = 3$). **C, D**, Western blot analysis and quantification of CREB protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of control mice, vehicle- and NMDA-treated type 2 SMA-like mice at 12 d of age ($n = 3$). **E, F**, Western blot analysis and quantification of CREB protein phosphorylation in the control and SMA spinal cord explants in presence or not of NMDA, MK801, BAPTA-AM, PI3K inhibitor LY294002, CaMKII inhibitor KN-93, and ERK inhibitor U0126 ($n = 3$). * $p < 0.05$. Error bars indicate SD.

tion was lost (supplemental Fig. 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). In all likelihood, our study further substantiates the concept that *in vivo* NMDAR activation might have two opposite effects on motor neuron survival, depending of the level of its activation. Indeed, although low NMDAR activation triggered AKT phosphorylation in SMA spinal cord, cor-

relating with a significant decrease of caspase activation, a treatment with a toxic dose of NMDA decreased AKT phosphorylation, resulting in the promotion of motor neuron death (supplemental Fig. 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). A dose effect in the physiology of the NMDAR has been previously reported in cultured cortical neurons on the basis of the pattern of CREB phosphorylation (Lee et al., 2005). Therefore, taking into account this biphasic effect in which both the near absence of and the excessive NMDAR activation could be harmful, an appropriately dosed NMDA treatment of SMA spinal cord might reinitiate a beneficial NMDAR signaling for motor neurons, without reaching a level that could induce neuron apoptosis.

In addition, we report here a complete *in vivo* characterization of an intracellular pathway activated downstream the NMDARs in the ventral spinal cord and leading to the activation of SMN2 gene expression. We have found that the Ca^{2+} -dependent activation of the PI3K/AKT signaling pathway, but not the ras/MAPK pathway, leads to the NMDA-induced phosphorylation of CREB and then to the increased SMN gene expression in the ventral spinal cord of type 1 SMA-like mice. These results contrast with the chain of events in cultured cortical neurons, in which the NMDA-mediated activation of CREB depends on ERK activation (Lee et al., 2005), suggesting a cell specificity in the activation of signaling pathways downstream the NMDAR. The Ca^{2+} influx through the low-activated NMDARs regulates CaMKII, which activation proved to be essential for NMDA-induced SMN2 gene activation of expression. Indeed, a toxic NMDA dose does reduce CaMKII activity (supplemental Fig. 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material), suggesting that CaMKII might determine which NMDAR-mediated cellular response will occur, either apoptosis or survival. These results account for those reported in cultured rat hippocampal cells in which a treatment with toxic doses of NMDA induced a reduction of CaMKII activation (Morioka et al., 1995). Interestingly for SMA, in addition to its kinase activity, CaMKII is also known to directly bind with actin and to induce the actin cytoskeleton reorganization in cultured neurons (Shi and Ethell, 2006), leading to the control of filopodia extension and branching as well as the control of the number of synapses (Fink et al., 2003). Thus, in the spinal cord of NMDA-treated SMA-like mouse models, activated CaMKII may stabilize motor neuron cytoskeleton, thus participating in the maintenance of the motor units.

Finally, the NMDA treatment led to a remarkable increase of SMN protein rate in SMA spinal cord. Interestingly, depending on the SMA-like mouse strain, the NMDAR activation resulted in either a strictly transcriptional (type 1 SMA-like mice) or a strictly posttranscriptional (type 2 SMA-like mice) effect on SMN expression. This difference in NMDA effects may be related to the characteristics of the SMN2 transgene used in each mouse model [i.e., a transgene containing only the human SMN2 gene in type 1 SMA-like mice (Monani et al., 2000) or a transgene including the human SMN2 gene and the neighboring genes in the type 2 SMA-like mice (Hsieh-Li et al., 2000)]. It could be speculated that, since alternative splicing is sometimes coupled with transcription rate (Allemand et al., 2008), the genomic context may contribute to the differential effects observed after NMDA treatment in each model. Alternatively, the differential effect of NMDA might be attributable to the time course of NMDA administration, immediately after birth or from 8 d of age, in type 1 and type 2 SMA-like mice, respectively. This hypothesis accounts for the developmental regulation of *Smn* gene expression (Germain-Desprez et al., 2001; Gabanella et al., 2005), substantiating the idea that different

molecular mechanisms, including *trans*-acting factors or *cis*-acting events, would be functional at specific time intervals during the postnatal maturation of motor neurons. In this context, on the basis of the present data, CREB might represent a key protein for the modulation of SMN2 gene transcription in neonatal SMA spinal cord. Indeed, activated at birth by the NMDA treatment, CREB might bind to the SMN2 gene promoter, which harbors two functional CRE sites considered essential for *Smn* gene transactivation (Majumder et al., 2004). The molecular basis of the time-dependent NMDA-induced SMN2 transgene expression remains to be investigated. Furthermore, additional identification of the molecular mechanisms that are triggered by NMDAR activation and result in the promotion of exon 7 inclusion in SMN transcripts opens the way to develop new therapeutic strategy for SMA. It should be noted that, in this context, the NMDA treatment mimics the effects of a running-based training in the same SMA-like mouse strain (Grondard et al., 2005), suggesting the activation of common intracellular mechanisms in electrically stimulated motor neurons.

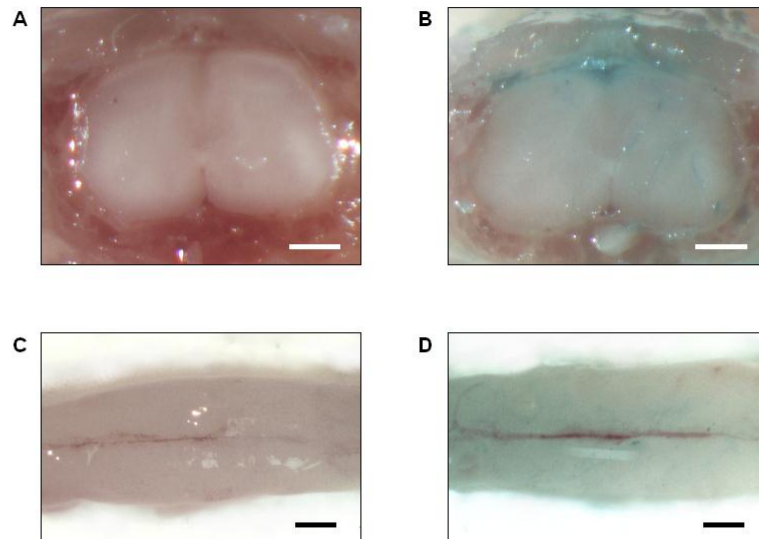
Together, all these results indicate that the adequate activation of the NMDARs in the SMA mouse spinal cord could be considered as an efficient means of promoting SMN gene expression, leading to an increase in survival and in motor capacities. Importantly, the beneficial effects of the NMDA treatment was observed in two different SMA mouse models, which were differently engineered in terms of *Smn* gene invalidation (exon 2 or exon 7 targeted in type 1 and type 2 SMA-like mice, respectively) and of SMN2 transgene (only SMN2 or a larger genomic region in type 1 and type 2 SMA-like mice, respectively) (Hsieh-Li et al., 2000; Monani et al., 2000). Needless to say, the transposition of our results collected in animal models to human patients is beyond the scope of this study. The determination of the nociceptive threshold and the efficient doses of NMDA constitute an absolute preliminary requirement conditioning the use of NMDA or NMDA receptor agonists in human SMA patients.

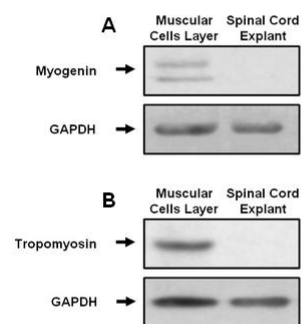
References

- Allemand E, Batsché E, Muchardt C (2008) Splicing, transcription, and chromatin: a ménage à trois. *Curr Opin Genet Dev* 18:145–151.
- Andreassi C, Patrizi AL, Monani UR, Burghes AH, Brahe C, Eboli ML (2002) Expression of the survival of motor-neuron (SMN) gene in primary neurons and increase in SMN levels by activation of the *N*-methyl-D-aspartate glutamate receptor. *Neurogenetics* 4:29–36.
- Biondi O, Grondard C, Lécolle S, Deforges S, Pariset C, Lopes P, Cifuentes-Diaz C, Li H, della Gaspara B, Chanoine C, Charbonnier F (2008) Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* 28:953–962.
- Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 11:297–305.
- Cartaud A, Strohlic L, Guerra M, Blanchard B, Lambergon M, Krejci E, Cartaud J, Legay C (2004) MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 165:505–515.
- Chandler LJ, Sutton G, Dorairaj NR, Norwood D (2001) *N*-Methyl-D-aspartate receptor-mediated bidirectional control of extracellular signal-regulated kinase activity in cortical neuronal cultures. *J Biol Chem* 276:2627–2636.
- Crair MC, Malenka RC (1995) A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature* 375:325–328.
- Crawford TO, Pardo CA (1996) The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* 3:97–110.
- Fink CC, Bayer KU, Myers JW, Ferrell JE Jr, Schulman H, Meyer T (2003) Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. *Neuron* 39:283–297.
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A (1997) Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275:665–668.
- Fukunaga K, Soderling TR, Miyamoto E (1992) Activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C by glutamate in cultured rat hippocampal neurons. *J Biol Chem* 267:22527–22533.
- Gabanel F, Carissimi C, Usiello A, Pellizzoni L (2005) The activity of the spinal muscular atrophy protein is regulated during development and cellular differentiation. *Hum Mol Genet* 14:3629–3642.
- Germain-Desprez D, Brun T, Rochette C, Semionov A, Rouget R, Simard LR (2001) The SMN genes are subject to transcriptional regulation during cellular differentiation. *Gene* 279:109–117.
- Grondard C, Biondi O, Armand AS, Lécolle S, Della Gaspara B, Pariset C, Li H, Gallien CL, Vidal PP, Chanoine C, Charbonnier F (2005) Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* 25:7615–7622.
- Hardingham GE, Bading H (2003) The yin and yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 26:81–89.
- Hardingham GE, Arnold FJ, Bading H (2001) Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat Neurosci* 4:261–267.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5:405–414.
- Hetman M, Kanning K, Cavanaugh JE, Xia Z (1999) Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 274:22569–22580.
- Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, Li H (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 24:66–70.
- Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vöckler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovská V, Turski L, Olney JW (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283:70–74.
- Ikonomidou C, Stefovská V, Turski L (2000) Neuronal death enhanced by *N*-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12885–12890.
- Kalb RG (1994) Regulation of motor neuron dendrite growth by NMDA receptor activation. *Development* 120:3063–3071.
- Kalb RG, Hockfield S (1992) Activity-dependent development of spinal cord motor neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 17:283–289.
- Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, Leykekhman O, Lutz C, Arkovitz MS, Landmesser LT, Monani UR (2008) Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 17:2552–2569.
- Kirkwood A, Bear MF (1995) Elementary forms of synaptic plasticity in the visual cortex. *Biol Res* 28:73–80.
- Kobayashi T, Askanas V, Engel WK (1987) Human muscle cultured in monolayer and cocultured with fetal rat spinal cord: importance of dorsal root ganglia for achieving successful functional innervation. *J Neurosci* 7:3131–3141.
- Kong L, Wang X, Choe DW, Polley M, Burnett BG, Bosch-Marcé M, Griffin JW, Rich MM, Sumner CJ (2009) Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 29:842–851.
- Lafon-Cazal M, Perez V, Bockaert J, Marin P (2002) Akt mediates the anti-apoptotic effect of NMDA but not that induced by potassium depolarization in cultured cerebellar granule cells. *Eur J Neurosci* 16:575–583.
- Lee B, Butcher GQ, Hoyt KR, Impey S, Obrietan K (2005) Activity-dependent neuroprotection and cAMP response element-binding protein (CREB): kinase coupling, stimulus intensity, and temporal regulation of CREB phosphorylation at serine 133. *J Neurosci* 25:1137–1148.
- Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80:155–165.
- Lladó J, Calderó J, Ribera J, Tarabal O, Oppenheim RW, Esquerda JE (1999) Opposing effects of excitatory amino acids on chick embryo spinal cord motoneurons: excitotoxic degeneration or prevention of programmed cell death. *J Neurosci* 19:10803–10812.
- Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35:605–623.

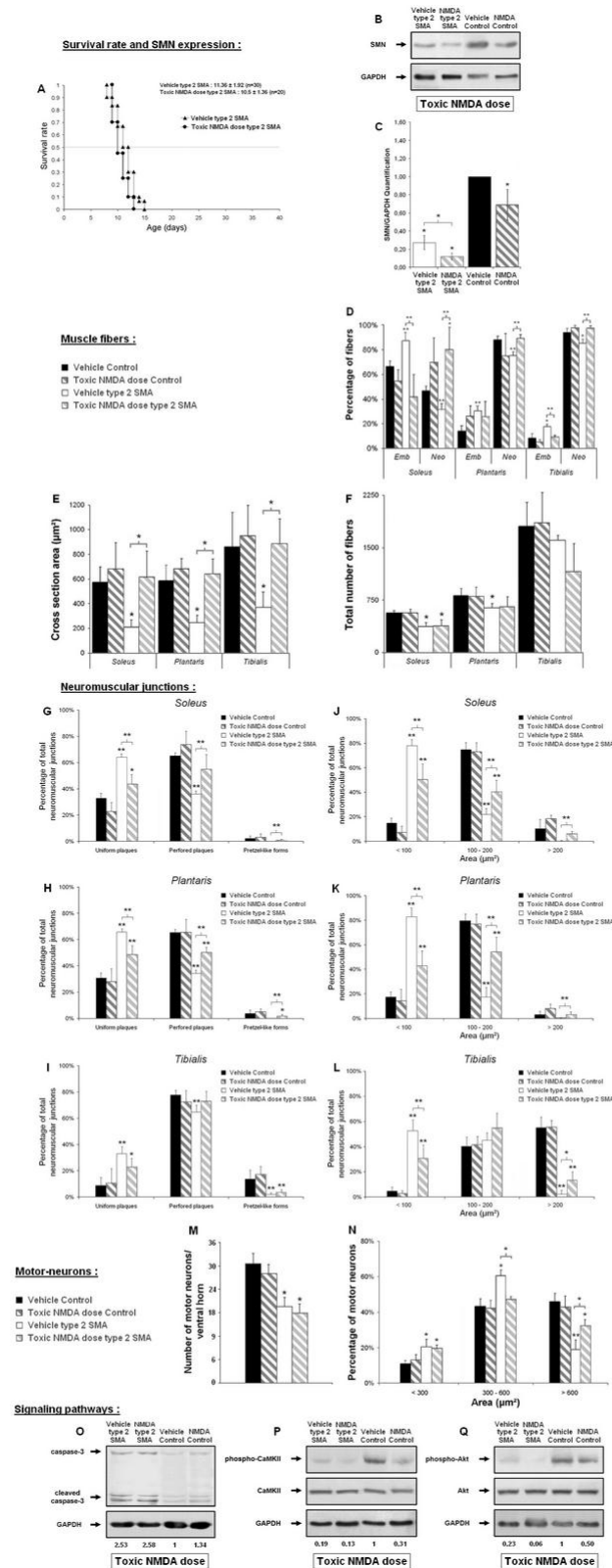
- Lorson CL, Androphy EJ (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet* 9:259–265.
- Majumder S, Varadharaj S, Ghoshal K, Monani U, Burghes AH, Jacob ST (2004) Identification of a novel cyclic AMP-response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene. *J Biol Chem* 279:14803–14811.
- Martínez-Hernández R, Soler-Botija C, Also E, Alias L, Caselles L, Gich I, Bernal S, Tizzano EF (2009) The developmental pattern of myotubes in spinal muscular atrophy indicates prenatal delay of muscle maturation. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:474–481.
- McGovern VL, Gavrilina TO, Beattie CE, Burghes AH (2008) Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse. *Hum Mol Genet* 17:2900–2909.
- Monani UR, McPherson JD, Burghes AH (1999) Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). *Biochim Biophys Acta* 1445:330–336.
- Monani UR, Sendtner M, Covert DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossoll W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*^{-/-} mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 9:333–339.
- Morioka M, Fukunaga K, Nagahiro S, Kurino M, Ushio Y, Miyamoto E (1995) Glutamate-induced loss of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 64:2132–2139.
- Papadia S, Hardingham GE (2007) The dichotomy of NMDA receptor signaling. *Neuroscientist* 13:572–579.
- Papadia S, Stevenson P, Hardingham NR, Bading H, Hardingham GE (2005) Nuclear Ca²⁺ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J Neurosci* 25:4279–4287.
- Shi Y, Ethell IM (2006) Integrins control dendritic spine plasticity in hippocampal neurons through NMDA receptor and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated actin reorganization. *J Neurosci* 26:1813–1822.
- Sutton G, Chandler LJ (2002) Activity-dependent NMDA receptor-mediated activation of protein kinase B/AKT in cortical neuronal cultures. *J Neurochem* 82:1097–1105.
- Towbin H, Schoenenberger C, Ball R, Braun DG, Rosenfelder G (1984) Glycosphingolipid-blotting: an immunological detection procedure after separation by thin layer chromatography. *J Immunol Methods* 72:471–479.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326–1331.

supplemental Fig. 1





supplemental Fig. 3



3.2. Conclusions de l'article 1

Dans cet article, nous avons démontré que l'activation adéquate des NMDARs pouvait être bénéfique pour les souris mimant les SMA de type I et II. Nous avons constaté que l'espérance de vie de ces souris ainsi que leur croissance augmentaient. De plus, ce traitement permet une augmentation significative de la force musculaire et de l'activité spontanée des souris malades comparées aux souris malades traitées avec un placebo.

Du point de vue cellulaire, nos résultats prouvent que l'activité des NMDARs est neuroprotectrice et accélère la maturation postnatale des unités motrices. Ainsi, les motoneurons de la moelle épinière lombaire sont plus nombreux et plus larges chez les souris mimant la SMA traitées au NMDA. Par voie de conséquence, on observe une diminution de l'atrophie dans les 3 muscles étudiés et une accélération de la transition des fibres embryonnaires vers le phénotype néonatal.

L'analyse des cascades de signalisation intracellulaire, en aval des NMDARs activés, a révélé une compétition inattendue pour la régulation du gène *SMN2* entre les voies de signalisation MEK/ERK et PI3K/AKT/CREB. En effet, l'inhibition de MEK/ERK et la réactivation parallèle de la voie PI3K/AKT/CREB, suite à un influx de calcium et la phosphorylation de CaMKII, induit une expression accrue de la protéine SMN. Par ailleurs, l'activation pharmacologique des NMDARs, chez les souris mimant la SMA de type I, à P6, augmente significativement le niveau d'expression du transgène *SMN2*. Tandis que dans les souris mimant la SMA de type II, à P12, le traitement modifie le profil d'expression du transgène *SMN2*. Dans ce cas, le traitement, favorise l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2*, comme observé précédemment chez ces souris lors de l'exercice.

Ces effets bénéfiques sont dépendants du niveau d'activation des NMDARs, puisqu'un traitement avec des doses élevées de NMDA conduit à une accélération de la maturation des unités motrices, mais, en contrepartie, favorise le processus d'apoptose et diminue l'expression de la protéine SMN. Ces derniers résultats suggèrent que l'accélération de la maturation postnatale des unités motrices, induite par le NMDA, est indépendante du niveau de protéine SMN.

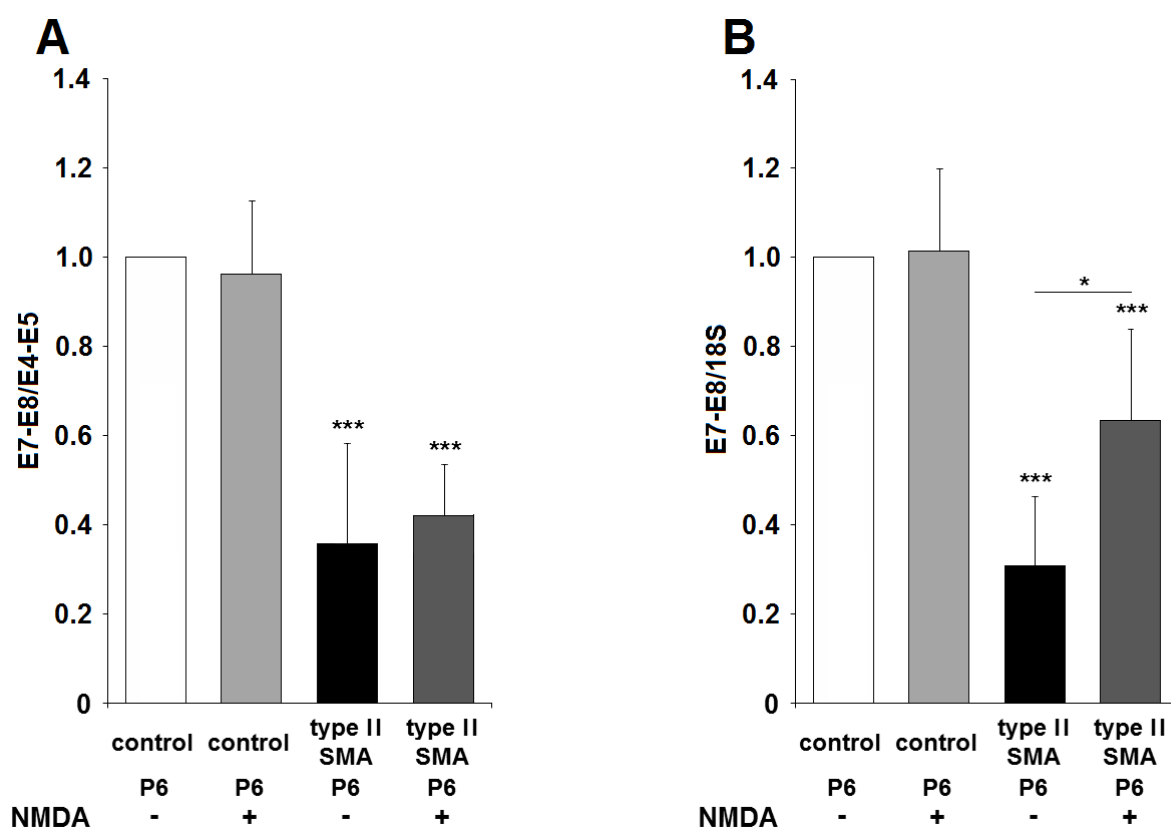
L'ensemble de ces résultats permet de proposer que les NMDARs jouent un rôle dans la neuroprotection déclenchée par l'exercice physique. L'identification des mécanismes moléculaires contrôlant la transcription ou le profil d'épissage du transgène *SMN2*, en aval de l'activation des NMDARs, constitue une voie de recherche novatrice qui pourrait déboucher sur de nouvelles applications thérapeutiques. Malheureusement, des agents thérapeutiques conduisant à la réactivation spécifique de la voie AKT/CREB dans les motoneurons avec des effets secondaires mineurs n'ont pas encore été développés.

3.3. Résultats complémentaires à l'article 1

3.3.1. Transcrits SMN dans les souris mimant la SMA de type II traitées au NMDA de la naissance à 6 jours

Nous avons démontré dans l'article 1, que l'activation *in vivo* des NMDARs augmentait l'expression de la protéine SMN dans la moelle épinière de deux modèles murins mimant la SMA. De plus, dans les souris mimant la SMA de type I, nous avons déterminé que cette augmentation résultait d'une hausse de la transcription du gène *SMN2*. A l'inverse, dans les souris mimant la SMA de type II, cette augmentation est liée à une augmentation de l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2*, comme observé à l'exercice. Ainsi, pour une même stimulation des NMDARs, le gène *SMN2* peut être modulé de deux manières différentes.

Nous avons voulu déterminer si ce phénomène de modulation, soit par augmentation de la transcription soit par inclusion de l'exon 7, était dépendant du modèle de souris ou du stade de maturation postnatal. Pour ce faire, nous avons traité au NMDA des souris mimant la SMA de type II de leur naissance jusqu'à P6, comme réalisé précédemment pour les souris mimant la SMA de type I.



A et B. Quantification par RT-PCR des transcrits *SMN2* contenant le segment exon 7-8, normalisés par les transcrits *SMN2* contenant le segment exon 4-5 (**A**) ou par les transcrits 18S (**B**), dans la moelle épinière lombaire ventrale de souris contrôles ou mimant la SMA de type II à 6 jours après un traitement avec un placebo ou du NMDA (n=9). Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm l'écart moyen. (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

Nous avons constaté que le traitement au NMDA, entre la naissance et P6, induisait une augmentation de la transcription du gène *SMN2* chez les souris mimant la SMA de type II. En revanche, ce traitement n'induit aucune modification du profil d'épissage au niveau de

l'exon 7 du gène *SMN2*. Par conséquent, les transgènes *SMN2* des modèles murins mimant la SMA de type I et II se comportent de la même manière en réponse à une stimulation des NMDARs de P1 à P6.

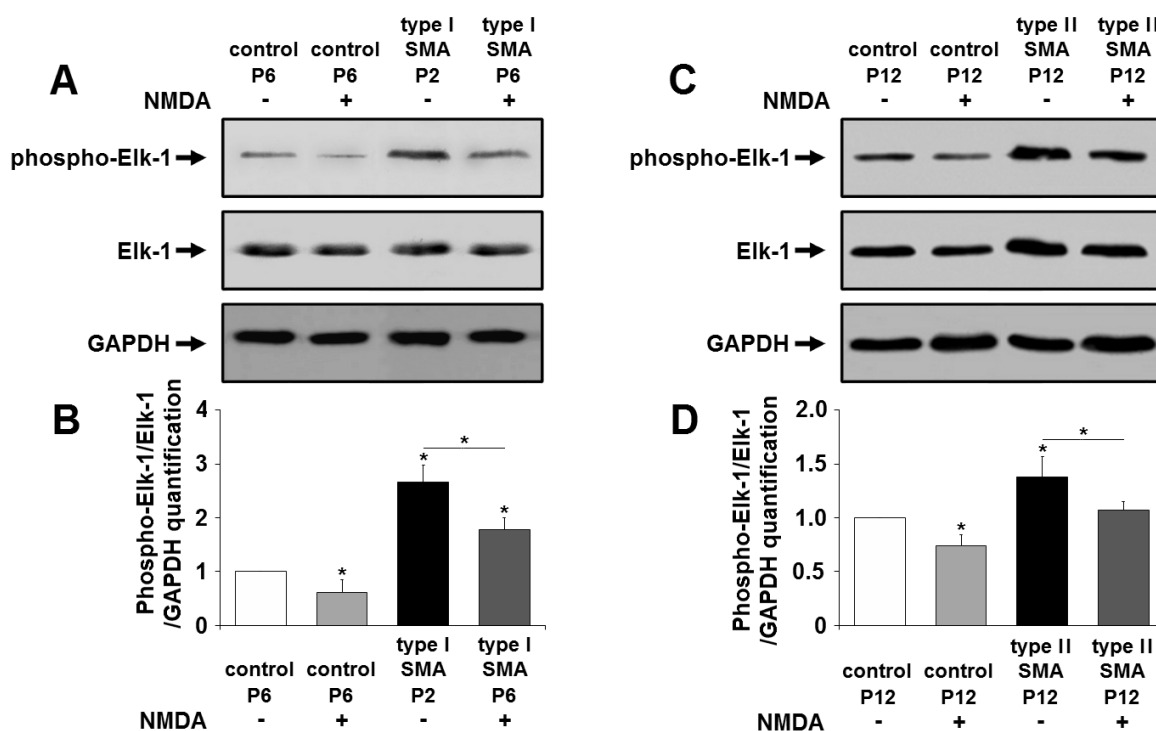
D'une part, on peut supposer que stimulation des NMDARs fait intervenir un certain type de composant de la machinerie cellulaire dans les premiers stades néonataux. Ceux-ci aboutissent à la hausse de la transcription du gène *SMN2* mais ne modifient pas son profil d'épissage. D'autre part, on peut supposer que cette même stimulation fait intervenir d'autres composants après l'acquisition de la marche. Cette fois-ci, aboutissant uniquement à l'augmentation de l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2*, comme observé à l'exercice.

3.3.2. Évaluation de la phosphorylation de Elk-1 dans la moelle épinière lombaire des souris SMA de type I et II traitées au NMDA

Nous avons constaté dans l'article 1 que l'activation de la voie AKT/CREB était constitutivement diminuée dans la moelle épinière des souris mimant la SMA de type I. Sa réactivation, suite à l'activation des NMDARs, atténue les symptômes chez ces souris malades. De plus, la réactivation de la voie AKT/CREB est suivie d'une augmentation générale des transcrits *SMN2*, sans aucune modification du profil d'épissage. Ce qui suggère que la régulation des transgènes *SMN2* dans les premiers stades postnatals a lieu au niveau transcriptionnel. De plus, la voie AKT/CREB promeut les phénomènes antiapoptotiques (Dudek et coll., *Science*, 1997).

Nous avons constaté également que ERK1/2 était constitutivement suractivé dans la moelle épinière des souris mimant la SMA de type I ou la SMA de type II. En outre, une réactivation de la voie AKT est corrélée avec une diminution de l'activation de la voie ERK1/2. Ces données, nous ont amené à penser qu'il existait une balance entre les voies AKT et ERK1/2 qui modulerait l'expression du gène *SMN2* dans les moelles épinières.

C'est pourquoi, nous avons voulu évaluer le niveau de phosphorylation de Elk-1, un facteur de transcription de la famille ETS connu pour être une cible directe de ERK (Whitmarsh et coll., *Science*, 1995; Johnson et coll., *J Neurosci*, 1997; Yang et coll., *Embo J*, 1999; Zhang et coll., *Nucleic Acids Res*, 2008) et ayant des éléments de réponse sur le promoteur du gène *SMN2*.



A-D. Analyse par western immunoblot et quantification de la phosphorylation de la protéine Elk-1 dans la moelle épinière lombaire ventrale de souris contrôles ou mimant la SMA de type I après un traitement avec un placebo ou du NMDA (**A** et **B**) (n=3) ou de souris contrôles ou mimant la SMA de type II après un traitement avec un placebo ou du NMDA (**C** et **D**) (n=3). Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes \pm l'écart moyen. (*, $p < 0.05$).

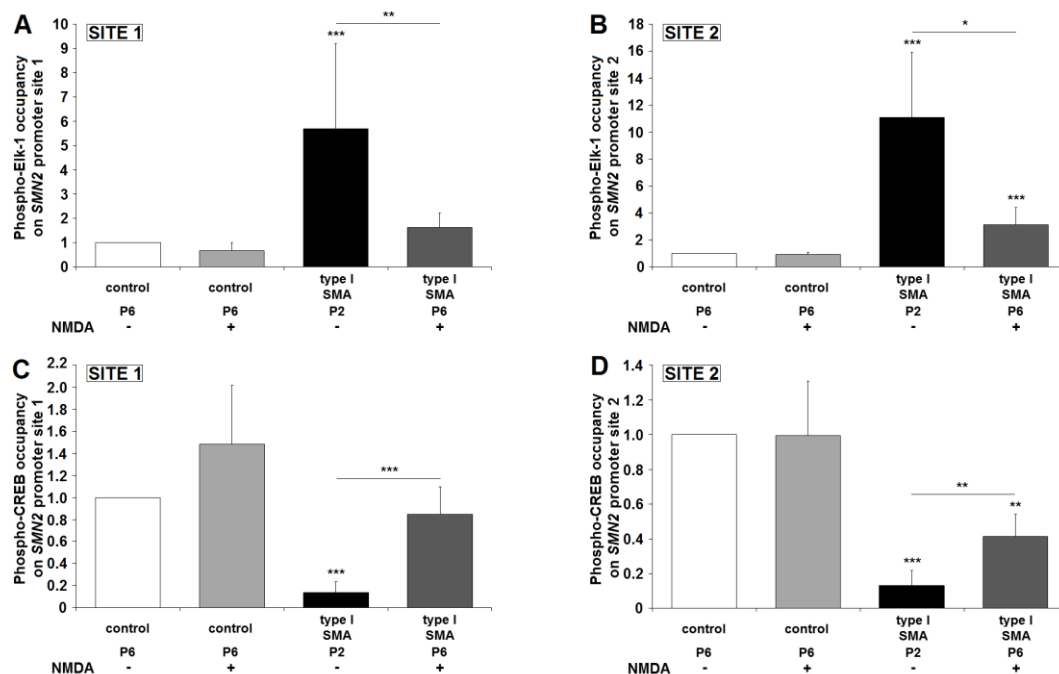
Nous avons constaté que Elk-1 était suractivé dans les moelles épinières des souris mimant la SMA de type I ou de type II, comme attendu pour une cible directe de ERK. Par

ailleurs, l'activation des NMDARs induit une diminution la phosphorylation de Elk-1 chez les souris mimant la SMA et chez les souris contrôles. Les taux d'expression de Elk-1 sont inversement proportionnels à ceux de CREB, ce qui conforte l'hypothèse que la modulation de l'expression du gène *SMN2* pourrait dépendre de la balance entre les voies AKT et ERK1/2.

3.3.3. Liaison de p-CREB et p-Elk-1 sur le promoteur de *SMN2* après traitement au NMDA

Dans les souris mimant la SMA de type I, le traitement au NMDA induit une augmentation de la transcription du gène *SMN2*. C'est pourquoi nous nous sommes penchés sur la séquence du promoteur du gène *SMN2* (GenBank accession AF187725). Il s'avère que le promoteur contient différents sites CRE de fixation pour CREB flanqués de sites ETS ou SFR de fixation pour Elk-1.

Dans un premier temps, nous avons identifié une séquence (appelée « site 1 ») contenant deux sites potentiels de fixation pour CREB (-2572 à -2569 bp et -2525 à -2522 bp) et deux sites potentiels de fixation pour Elk-1 (-2556 à -2548 bp). Dans un second temps, nous avons identifié une autre séquence (appelée « site 2 ») présentant un site de liaison à CREB, considéré comme régulateur positif de l'expression de *SMN2* (Majumder et coll., *J Biol Chem*, 2004) et trois éléments de réponse à Elk-1 (+356 à +359 bp, +401 à +414 bp et +426 à +429 bp).



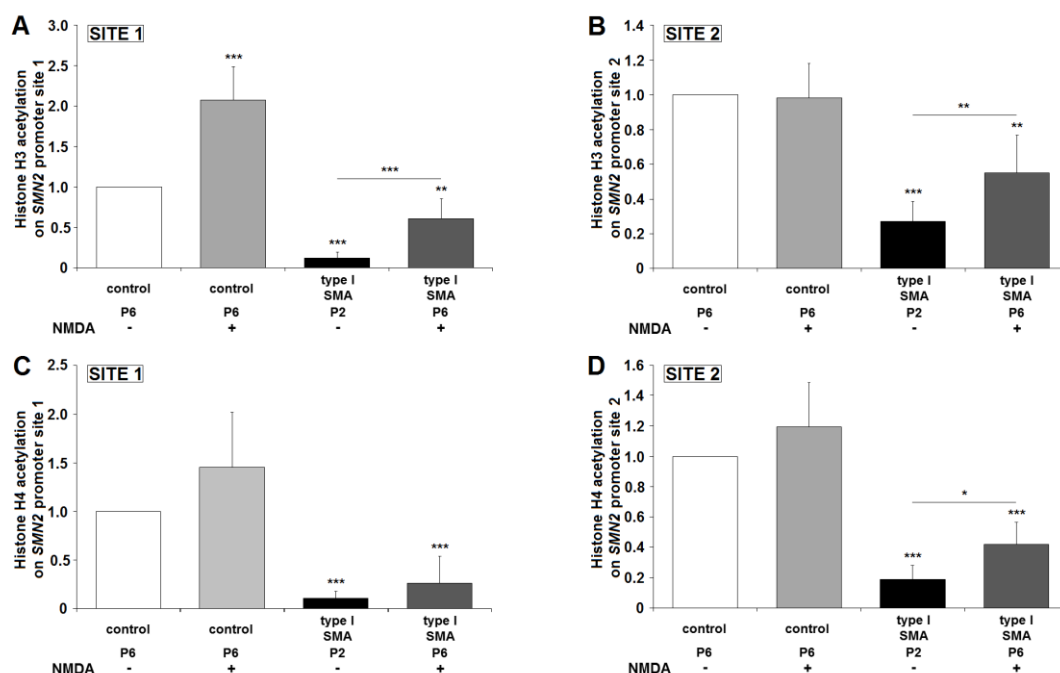
A-D. Analyse de la fixation phospho-Elk-1 (**A** et **B**) et de phospho-CREB (**C** et **D**) dans la moelle épinière lombaire ventrale de souris contrôles à 6 jours traitées avec un placebo ou du NMDA, de souris mimant la SMA de type I à 2 jours traitées avec un placebo et de souris mimant la SMA de type I à 6 jours traitées avec du NMDA. La PCR quantitative en temps réelle a été conçue pour détecter le site 1 du promoteur *SMN2* (**A** et **C**) et le site 2 (**B** et **D**). Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes \pm l'écart moyen. (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$)

Les expériences de ChIP montrent que les deux facteurs de transcriptions Elk-1 et CREB sont capables de se lier aux sites 1 et 2 du promoteur du gène *SMN2*. Leur niveau de fixation est corrélé avec leur niveau d'activation dans la moelle épinière. Elk-1, qui est suractivé chez les souris mimant la SMA de type I, est, en effet, fortement présent sur les deux sites du promoteur du gène *SMN2* chez ces souris comparées aux contrôles. En revanche, les expériences de ChIP révèlent une diminution drastique de la liaison de CREB au deux sites du promoteur chez les souris mimant la SMA de type I.

Nous avons constaté, chez les souris mimant la SMA de type I, que les taux de liaison de CREB et Elk-1 étaient modifiés suite à une activation des NMDARs. Ainsi, le traitement au NMDA induit une baisse de la fixation de Elk-1 sur les sites 1 et 2 au profit de la fixation de CREB. A noter, que l'activation des NMDARs ne change pas les profils de fixations de ces deux facteurs de transcription chez les souris contrôles.

3.3.4. Niveau d'acétylation des histones H3 et H4 sur le promoteur de *SMN2* après traitement au NMDA

Afin d'évaluer les rôles potentiels de Elk-1 et CREB sur le contrôle de l'expression du gène *SMN2* dans la moelle épinière des souris contrôles et mimant la SMA de type I, nous avons déterminé le niveau d'acétylation des histones H3 et H4 sur les sites 1 et 2.



A-D. Analyse l'acétylation de la lysine 9 de l'histone H3 (**A** et **B**) et de la lysine 8 de l'histone H4 (**C** et **D**) dans la moelle épinière lombaire ventrale de souris contrôles à 6 jours traitées avec un placebo ou du NMDA, de souris mimant la SMA de type I à 2 jours traitées avec un placebo et de souris mimant la SMA de type I à 6 jours traitées avec du NMDA. La PCR quantitative en temps réelle a été conçu pour détecter le site 1 du promoteur *SMN2* (**A** et **C**) et le site 2 (**B** et **D**).

Nous avons constaté que le recrutement de Elk-1 sur les deux sites est associé à une diminution marquée de l'acétylation des histones H3 et H4. En revanche lorsque que CREB est présent, les histones H3 et H4 sont acétylées. Ce qui implique que la chromatine est dans une configuration plus relâchée et accessible à la machinerie de transcription.

L'ensemble de ces résultats suggère que la voie AKT/CREB est un relai moléculaire permettant l'augmentation de la protéine SMN suite à une activation des NMDARs. A l'inverse, la voie ERK/Elk-1 semble être dans la SMA une voie de répression de l'expression du gène *SMN* dans la moelle épinière, ce qui contraste avec les résultats trouvés dans un contexte non neuronal (Demir et coll., *Biochim Biophys Acta*, 2011).

3.3.5. Matériel et méthodes

Souris et traitements :

Les souris mimant la SMA de type I, possédant 2 copies du transgène humain *SMN2* ont été achetées chez les laboratoires Jackson et ont été génotypées, comme décrit précédemment (Monani et coll., *Hum Mol Genet*, 2000).

Les souris *Smn* $\Delta 7^{+/+}$; *SMN2* ont été obtenues à l'institut de Biologie Moléculaire de l'Academia Sinica (Taipei, Taiwan). Ces souris dérivant de la lignée transgénique décrite par Hsieh Li et coll. possèdent 2 copies du transgène humain *SMN2* (Hsieh-Li et coll., *Nat Genet*, 2000; Tsai et coll., *Eur J Hum Genet*, 2006). Cette souche de souris a, par la suite, été purifiée 10 fois par croisement avec le fond génétique FVB/NRj (Janvier, Le Genest-St-Isle, France). Les souris hétérozygotes pour *Smn* (*Smn* $\Delta 7^{+/-}$) ont été croisées avec les souris transgéniques hétérozygotes (*Smn* $\Delta 7^{+/-}$; *SMN2*). Les souriceaux sont génotypés par PCR classique après extraction de l'ADN contenu dans des bouts de queues, comme décrit précédemment (Grondard et coll., *J Neurosci*, 2005). Afin de standardiser le phénotype des souris mâles et femelles mimant la SMA de type II, seules celles dont le poids est compris entre 3 et 4 g à 8 jours postnatals ont été utilisées, comme décrit précédemment (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008).

Les groupes de souris traitées avec un placebo ou avec du NMDA ont été constitués systématiquement en aveugle afin de minimiser les biais expérimentaux. Les souris contrôles proviennent systématiquement des mêmes portées et sont hétérozygotes pour le gène *Smn* murin et possèdent les transgènes humains *SMN2*. Afin d'évaluer les effets d'une activation des récepteurs au NMDA, les souris reçoivent une injection intrathécale quotidienne de 5 pmol/g de NMDA (100 μ M) (Sigma-Aldrich) dans 0,5 μ l de NaCl 0,9% coloré au Bleu Evans. Les souris contrôles ou mimant la SMA de type I ont été injectées tous les jours de leur naissance jusqu'à leur 6^e jour postnatal. Les souris contrôles et mimant la SMA de type II ont été injectées tous les jours soit de leur naissance jusqu'à leur 6^e jour postnatal, ou de leur 8^e jour postnatal à leur 12^e jour postnatal. Ces souris ont été comparées à des souris contrôles ou mimant la SMA injectées avec 0,5 μ l/g de NaCl 0,9% coloré au Bleu Evans. Les moelles épinières de souris ont systématiquement été enlevées et la coloration au Bleu Evans vérifiée.

Les animaux ont été considérés morts lorsqu'ils n'étaient plus capables d'émettre un mouvement après avoir été placés sur leur flanc. Les conditions d'élevage des souris sont en accord avec les prérogatives du Ministère de la Recherche et de l'Industrie concernant l'utilisation et le stockage d'organismes transgéniques. Le traitement par le NMDA *in vivo* a été approuvé par le comité éthique local (numéro P2.CC.034.07).

Immunoprécipitation de la Chromatine :

Les échantillons de cornes ventrales de moelle épinière lombaire (entre L1 et L5) ont été coupés en petits morceaux avec un scalpel et ont été fixés pendant 15 min avec du formaldéhyde à 1%. Les tissus ont été lavés 3 fois dans du PBS frais contenant des inhibiteurs de protéases (PMSF 2 mM, 50 μ g/ml de Leupeptine, 50 μ g/ml de Pepstatine A et 50 pg/ml d'Aprotinine) puis collectées après centrifugation. Les cellules, par la suite, ont été remises en suspension dans 300 μ l de KCl 85 mM, NP-40 0,5%, pipérazine-N, N'-bis-(2-ethanosulfonic acide) (PIPES) 5 mM pH 8,0 en présence d'inhibiteurs de protéases (PMSF 2 mM, 50 μ g/ml de Leupeptine, 50 μ g/ml de Pepstatine A et 50 pg/ml d'Aprotinine). Après une incubation dans la glace de 10 min, les cellules ont été soniquées 6 fois pendant 30 secondes en utilisant un Biorupteur (Diagenode, Philadelphia, PA). Les lysats ont été récoltés après centrifugation et la concentration d'ADN a été déterminée par un spectrophotomètre nanodrop. Les billes servant à capturer les protéines liées à l'ADN (ChIP-Adembeads, Ademtech SA, Pessac, France) ont été mises à incuber avec du tampon de

blocage pendant 15 min à température ambiante sur une roue. Puis les billes ont été resuspendues dans 125 µl de ChIP Dilution Buffer (SDS 0,01%, Triton X100 1%, EDTA 1,2 mM, Tris-HCl (pH 8,1) 16,7 mM) et, après 1h d'incubation, des quantités équivalentes d'ADN dilués 10 fois dans du ChIP Dilution Buffer ont été ajoutées. L'ADN a été mise à incuber la nuit à 4°C sur une roue avec 1µg des anticorps suivants : des anticorps polyclonaux fait chez le lapin dirigés contre la Serine 133 de phospho-CREB (Millipore), des anticorps monoclonaux fait chez la souris dirigés contre la serine 183 de phospho-Elk-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc), des anticorps polyclonaux fait chez le lapin dirigés contre la Lysine 9 de l'histone H3 acétylée (Millipore) et des anticorps polyclonaux fait chez le lapin dirigés contre la Lysine 8 de l'histone H4 acétylée (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY). Les billes ont été lavées séquentiellement dans du TSE NaCl 150 mM (SDS 0,1%, Triton X100 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl (pH 8,1) 20 mM) puis du TSE NaCl 500mM, du tampon A (LiCl 0,25 µM, NP-40 1%, deoxycholate 1%, EDTA 1 mM, Tris-Hcl (pH 8,1) 10 mM), deux fois dans du Tris-EDTA (pH 8,1) et finalement éluées avec 200 µl de SDS 1% et NaHCO₃ 0,1M. Les liaisons protéine-ADN ont été rompues en ajoutant du NaCl (200 µM de concentration finale) et en chauffant 4h à 65°C. Après traitement à la protéinase K (50µg/ml) pendant 1 h à 37°C, les ADN ont été purifié en utilisant le kit Geneclean Turbo (Q-Biogene, MP Biomedicals, Illkirch, France). Les ADN totaux (inputs) et immunoprécipités ont été analysés par PCR quantitative en temps réel.

Reverse Transcription et analyse en PCR quantitative en temps réel :

Les échantillons de cornes ventrales de moelle épinière lombaire ont été coupés en petits morceaux avec un scalpel et l'ARN a été extrait à l'aide de Trizol (Invitrogen). Chaque préparation d'ARN a été traité avec de la DNase RQ1 RNase-Free (Promega). Un microgramme a été reverse transcrit avec des amorces aléatoires (Promega) et de la transcriptase inverse M-MLV-RT (Invitrogen).

La PCR quantitative en temps réel a été réalisée avec l'aide du protocole standard utilisant le SYBR[®] Green ROX Mix (ABgene, Courtaboeuf, France) comme détecteur fluorescent par un appareil ABI PRISM[®] 7000. Le volume final de 10 µl contient également 300 nM des amorces suivantes (Operon, Cologne, Allemagne) :

Exon 4-Exon 5 de SMN2 sens : 5'-TGTGTTGTGGTTTACACTGG-3';
 Exon 4-Exon 5 de SMN2 antisens : 5'-TATTTCCAGGAGACCTGGAG-3';
 Exon 7-Exon 8 de SMN2 sens : 5'-AAAAAGAAGGAAGGTGCTCAC-3';
 Exon 7-Exon 8 de SMN2 antisens: 5'-GCCTCACCAACCGTGCTGG-3';
 18S sens : 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3';
 18S antisens : 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3';
 Site 1 du promoteur de SMN2 sens : 5'-GAGAGAGTTCCAGGAGTCAA-3';
 Site 1 du promoteur de SMN2 antisens : 5'-GTCTCAAACCTCGGTTGCTT-3';
 Site 2 du promoteur de SMN2 sens : 5'-TCGTAGAAAGCGTGAGAAGT-3';
 Site 2 du promoteur de SMN2 antisens: 5'-AAAACGCGGACCACAACCTC-3'.

Les valeurs des échantillons ont été déterminées suivant la méthode relative Ct, où la quantité de produit est normalisée en fonction de la quantité de contrôle endogène et donnée par rapport à l'échantillon témoin, donnée par la formule : $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Analyse protéique par Western Immunoblot :

Des échantillons de cornes ventrales de moelle épinière lombaire de 4 à 10mg ont été broyés par un piston dans de l'azote liquide et homogénéisées dans 100 µl de tampon RIPA refroidi dans de la glace (Tris HCl pH=8,0 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, sodium deoxycholate 0,5%, NP40 1%, EDTA pH=8,0 5 mM, PMSF (phenyl methylsulfonyl fluoride, Sigma-Aldrich) 2 mM, Leupeptin 50 µg/ml, Pepstatin A 50 µg/ml et Aprotinin 50 µg/ml) pour 5

mg de tissus total. La concentration en protéines dans les homogénats clarifiés par centrifugation (15 min, 13 500 tours.min⁻¹, 4°C) a été déterminée pour tous les échantillons par la technique de Bradford (Bradford Protein assay, Biorad Laboratories, CA). Dix microgrammes d'échantillon de chaque homogénat ont été soumis à une électrophorèse à travers un gel SDS-Page de 12,5% (Tris pH 8,3 1,5 M, PolyAcrylamide 12,5%, Bis 0,07%, SDS 1%, APS 0,5%, Temed 0,06%). Les protéines ainsi séparées ont été transférées sur une membrane PVDF (Biorad Laboratories, CA) suivant le protocole décrit précédemment (Towbin et coll., *J Immunol Methods*, 1984). Le dépôt égal en quantité de protéines pour chaque échantillon a été vérifié par coloration au Rouge Ponceau. La membrane a été, ensuite, décolorée et incubée 1h à température ambiante dans une solution de BSA 4%, TWEEN 20 0,05%, TBS pH 7,4. Les membranes ont ensuite été mises à incuber toute la nuit dans la même solution, en présence d'anticorps primaires monoclonaux fait chez la souris dirigés contre la Serine 183 de phospho-Elk-1 (1/1 000^e ; Santa Cruz Biotechnology, Inc). Les membranes ont été rincées dans du TBS TWEEN 20 0,1%, trois fois 10 min à température ambiante et mises à incuber avec des anticorps secondaires polyclonaux, fait chez la chèvre, anti-souris et conjugués à la peroxydase (1 : 5 000^e ; Biorad Laboratories, CA) dans la même solution que pour l'anticorps primaires. Le complexe d'anticorps ainsi constitué a été révélé par l'utilisation d'un kit ECL plus et exposé à un hyperfilm ECL-plus X ray (AMERSHAM Biotech.). Dans le cas présent, les membranes ont dû être dépouillées de tous les complexes d'anticorps avec du stripping buffer (β-mercaptoethanol 100 mM, SDS 2%, Tris-HCl pH 6,7 62,5 mM) pendant 30 min à 55°C sous agitation puis ont été saturées et ré-hybridées avec des anticorps monoclonaux fait chez la souris dirigés contre Elk-1 (1 : 1 000^e ; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) et contre la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (1 : 5 000^e ; Chemicon). Les films ont été quantifiés à l'aide d'imageJ v1.37 et les résultats sont représentés sous forme de moyenne ± l'écart type.

Analyses statistiques :

Toutes les valeurs sont représentées sous forme de moyenne ± écart type ou écart moyen en utilisant le logiciel Systat v 8.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Dans un premier temps, un test de distribution normale Kolmogorov-Smirnov a été réalisé sur l'ensemble des données. Puis dans un second temps, un test statistique de type test de T a été réalisé pour les données suivant une distribution normale afin de vérifier la significativité des différences intergroupes. Un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été réalisé pour les données suivant une distribution non-normale.

4. ARTICLE 2

Shift from ERK to AKT/CREB pathway increases SMN expression in Spinal-Muscular-Atrophy-like mice and patient cells

Julien Branchu¹, Olivier Biondi¹, Farah Chali¹,
Thibault Collin², Felix Leroy³, Kamel Mamchaoui⁴,
Joelle Makoukji¹, Claude Pariset¹, Philippe Lopes^{1,5},
Charbel Massaad¹, Christophe Chanoine¹
et Frédéric Charbonnier¹

¹ Université Paris Descartes, UFR Biomédicale, Centre d'étude de la sensorimotricité (CESeM), UMR 8194 CNRS, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France.

² Université Paris Descartes, UFR Biomédicale, Laboratoire de Physiologie cérébrale UMR 8118 CNRS, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France.

³ Université Paris Descartes, UFR Biomédicale, Neurophysique et physiologie du système moteur, UMR 8119 CNRS, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France.

⁴ Thérapie des maladies du muscle strié / Institut de Myologie UMRS 974 - UPMC Université Paris 6 / U974 - Inserm / UMR7215 – CNRS 47, Bd de l'hôpital - G.H. Pitié-Salpêtrière - Bâtiment Babinski, F-75651 Paris cedex 13, France

⁵ Université d'Evry-val-d'Essonne, Bd F. Mitterrand, F-91000 Evry, France

4.1. Introduction à l'article 2

Effet de l'inhibition de ERK dans un contexte de SMA.

Nous avons précédemment démontré que ERK était constitutivement surexprimé dans la moelle épinière lombaire de souris mimant la SMA de type sévère. Or l'augmentation de l'activité des NMDARs induit, d'une part, une réactivation de la voie PI3K/AKT/CREB qui augmente de manière accrue l'expression du gène *SMN2* et, d'autre part, la diminution de la voie MEK/ERK/Elk-1. L'ensemble de ces résultats suggèrent une compétition entre ces deux voies moléculaires pour la régulation de l'expression du gène *SMN2*.

Les agents thérapeutiques conduisant à la réactivation spécifique de la voie AKT/CREB dans les motoneurons sans effets secondaires n'existent pas encore ; c'est pourquoi nous avons évalué les effets de l'inhibition de la voie MEK/ERK dans un contexte de SMA. Pour ce faire, nous avons réutilisé le modèle souris mimant la SMA de type sévère développé par l'équipe d'Arthur Burghes. Ces souris, possédant une invalidation du gène *Smn* murin et des transgènes humains *SMN2*, meurent dans les 2 jours suivants leur naissance. De plus, avons utilisé des co-cultures myotubes/explants de moelle épinière d'embryon de souris mimant la SMA de type I et des cultures de cellules musculaires provenant de patients atteints de SMA de type II.

Nous avons administré tous les jours soit en intrathécal 5 pmol/g de U0126, soit en oral 5 pmol/g d'AZD6244 aux souris mimant la SMA de type I. Le traitement commençait dès la naissance. Afin d'évaluer l'impact de l'inhibition *in vivo* de la voie MEK/ERK, nous avons utilisé une approche pluridisciplinaire, associant des analyses comportementales à des analyses cellulaires et moléculaires.

Les études comportementales comprenaient la mesure de la durée de vie, du poids, du temps pour se redresser et de l'activité spontanée des souris traitées au U0126 par rapport aux souris traitées avec un placebo.

Les analyses cellulaires se sont focalisées sur les motoneurons spinaux. Nous avons observé, au cours du temps, le nombre et la morphologie des motoneurons spinaux chez les souris mimant la SMA et contrôles, traitées avec du U0126 ou un placebo. De plus, nous avons étudié le nombre de gems présents dans les noyaux de ces motoneurons spinaux.

Nous avons ensuite analysé le niveau d'expression et le profil d'épissage des transcrits issus du transgène *SMN2* dans la moelle épinière lombaire de ces souris. Cette analyse a été complétée par l'étude de la liaison des facteurs de transcription Elk-1 et CREB sur le promoteur du transgène *SMN2* et l'état d'acétylation de ces séquences. En outre, nous avons décrypté une part des voies en balance pour la régulation de l'expression du gène *SMN2*. Le rôle de chaque molécule clef a été confirmé *in vitro*, dans les co-cultures myotubes/explants de moelle épinière et les cultures de cellules musculaires provenant de patients atteints de SMA de type II.

Shift from ERK to AKT/CREB pathway increases SMN expression in Spinal-Muscular-Atrophy-like mice and patient cells

ABSTRACT

Spinal Muscular Atrophy (SMA), a recessive neurodegenerative disease, is characterized by the selective loss of spinal motor neurons. No available therapy exists for SMA, which represents one of the leading genetic causes of death in childhood. SMA is caused by a mutation of the Survival-of-Motor-Neuron 1 (SMN1) gene leading to a quantitative defect in the survival-motor-neuron (SMN) protein expression. All patients retain one or more copies of the SMN2 gene, which modulates the disease severity by producing a small amount of stable SMN protein. We have recently reported that NMDA receptor activation, directly in the spinal cord, significantly enhanced the transcription rate of the SMN2 genes in a mouse model of very severe SMA (referred as type1) by a mechanism that involved AKT/CREB pathway activation. Here, we provide the first compelling evidence for a competition between the MEK/ERK/Elk-1 and the PI3K/AKT/CREB signaling pathways for SMN2 gene regulation in the spinal cord of type 1 SMA-like mice. The inhibition of the MEK/ERK/Elk-1 pathway promotes the AKT/CREB pathway activation leading to 1) an enhanced SMN expression in the spinal cord of SMA-like mice and in human SMA myotubes and 2) a 2.8-fold life span extension in SMA-like mice. Furthermore, we have identified a crosstalk between ERK and AKT signaling pathways that involves the calcium-dependent modulation of CaMKII activity. Taken together all these data open new perspectives to the therapeutic strategy for SMA patients.

INTRODUCTION

Spinal Muscular Atrophy (SMA), an autosomal recessive disease for which no therapy is presently available, is the leading genetic cause of death in childhood. SMA is characterized by a specific loss of spinal motor neurons leading to a severe muscular weakness and irremediable death when vital muscles are affected (Crawford and Pardo, 1996). SMA can be classified into three types on the basis of the age of onset, time course and range of motor function loss. In the most severe type of SMA, referred to as type 1 or Werdnig-Hoffmann disease, which accounts for about 50% of patients diagnosed with SMA, the symptoms appear before 6 months of age and death occurs in infancy or early childhood. SMA is caused by mutation of the Survival-of-Motor-Neuron 1 (SMN1) gene (Lefebvre et al., 1995) leading to a deficiency of the survival-motor-neuron (SMN) protein expression. All patients retain one or more copies of the SMN2 gene, which modulates the disease severity by allowing a small amount of full-length SMN transcripts and stable SMN protein to be produced (Lorson and Androphy, 2000).

Since SMA is caused by an insufficient amount of SMN protein, a major aim of SMA therapeutics strategy is to increase the levels of SMN protein generated by SMN2 gene expression. A number of groups have identified SMN2 gene-inducing molecules (Chang et al., 2001; Avila et al., 2007; Thurmond et al., 2008; Tsai et al., 2008; Butchbach et al., 2010; Lorson et al., 2010), but so far, most of these agents yielded inconclusive results in clinical trials (Mercuri et al., 2007; Swoboda et al., 2009; Swoboda et al., 2010). An alternative promising therapeutic development for SMA, though as yet unexplored, could be based on the pharmacological correction of molecular mechanisms altered in SMA neuromuscular system such as the AKT/CREB and the ERK signaling pathways (Biondi et al., 2010). In striking contrast to AKT, the kinase ERK was found to be

constitutively over-activated in mouse SMA spinal cord (Biondi et al., 2010). These observations raise important questions about the potential role of the ERK pathway in the regulation of SMN2 gene expression that can be investigated in type 1 SMA-like mice spinal cord.

In the present paper, using myotube cultures from type 2 SMA patients and type 1 SMA-like mice, we provide the first lines of evidence indicating that 1) the MEK/ERK/Elk-1 pathway plays a repressive role on SMN2 gene expression in SMA spinal cord 2) the pharmacological inhibition of the MEK/ERK/Elk-1 pathway resulted in an efficient AKT/CREB pathway activation through a calcium-dependent activation of CaMKII, finally leading to the increase of SMN expression and a significant neuroprotection. Importantly, the treatment of type 1 SMA-like mice by Selumetinib which is currently in Phase II clinical trials (Board et al., 2009), induced a significant increase in SMA-like mouse lifespan, opening a new and promising way for treating the most severe types of this devastating disease.

MATERIALS AND METHODS

Mice and treatments. The The knockout-transgenic SMA-like mice (Tg(SMN2)^{tg/tg};Smn^{-/-} mice) were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and genotyped as previously described (Monani et al., 2000). To standardize the type 1 SMA phenotype, male and female SMA-like mice phenotypically distinguishable from littermates at birth (as described by Monani et al., 2000) were used for this study. The selected SMA-like mice were slightly smaller (average weight = 1.08 ± 0.7) than heterozygous littermates (average weight = 1.52 ± 0.14). This selection excludes the SMA-like mice that survived without any treatment for up to 4 days of age. Vehicle-treated group, U0126-treated group and AZD6244-treated group of type 1 SMA-like mice were randomly constituted, irrespective of weight or motor behavior in order to minimize bias. The control mice were heterozygous knock-out for Smn with the human SMN2 transgene.

In order to evaluate the benefits of phospho-ERK inhibition, P1 neonate control and type 1 SMA-like mice were injected daily until P2, P6 or until death intrathecally with 1 mg/kg of 1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(o-aminophenylmercapto)butadiene monoethanolate (U0126, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) in blue Evans dyed 0.9% NaCl 1% DMSO. Awake, conscious mice with intact muscle tone and reactions were injected at a 70-80° angle to the horizontal in the column maintained slightly curved to open up the intervertebral spaces. The injection is done over the course of 1–2 s. Mice were also treated per os with 5 mg/kg of Selumetinib (AZD6244, Selleck chemicals, Houston, TX) in 0.9% NaCl 1% DMSO, according to pharmacokinetics and pharmacodynamics in mice (Denton and Gustafson, 2011). For gavage, the head of the mice was maintained aligned with the esophagus and a small rubber cannula was gently inserted 0.5 cm down the esophagus behind the incisors and directed towards the back of the throat. During the injection course that should not exceed 1–2 s to avoid cyanosis of the mouse's mucous membranes.

The treated-mice were compared to control and SMA-like mice either injected from P1 with 0.5 µl/g blue Evans dyed 0.9% NaCl 1% DMSO or orally treated with 2 µl/g of 0.9% NaCl 1% DMSO. The life span of 0.9% NaCl 1% DMSO-treated mice (1.66 ± 0.55 days) prove to be similar to 0.9% NaCl-treated mice (1.65 ± 0.62 days, Biondi et al., 2010). Body weight and life span recordings

were performed every day until the death of the animal. The animals were considered as dead when mice were no longer able to stand up 1 min after having been placed on their sides.

The care and treatment of animals followed the national authority (Ministère de la Recherche et de la Technologie, France) guidelines for the detention, use and the ethical treatment of laboratory animals.

Behavioural evaluation. The time taken by mice to get back on their feet, after being placed on the right side, was recorded in vehicle- and U0126-treated control and SMA-like mice from birth to P9 or death. Each mouse was subjected to five successive attempts separated by a 5 min rest period.

The ambulatory behavior was assessed in an open-field test for vehicle- and U0126-treated control and SMA-like mice. The apparatus consisted in a plastic box measuring 15×15×5 cm. The floor of the arena was divided into 16 3×3 cm squares. The mice were tested individually and the open field was washed after each session. Each mouse initially placed in the center of the open field was allowed to move freely for 5 min. The behavioral measures recorded manually by the experimenter during these 5 min were the total number of square crossings and the mobility time.

Mouse cell cultures and treatments. Co-cultures of mouse spinal cord explants (around 1 mm³) and muscle cells were performed as described by Kobayashi et al. for rat (Kobayashi et al., 1987) with the following modifications. Spinal cord explants were obtained from control and severe SMA-like embryonic mice. Explants from the whole transverse slices of 10.5 days-old mice embryo spinal cords including dorsal root ganglia (DRG) were placed on the muscle monolayer. DRG are essential to ensure a good innervation ratio (Kobayashi et al., 1987). The muscle culture was established through the differentiation of the wild-type muscle cell line C2C12. Myoblast cells were cultured on 35 mm petri dish at 37°C in 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 2 mM glutamine, 20% fetal bovine serum, 2% penicillin/streptomycin (5000 U). All the culture medium reagents were purchased from Invitrogen Life Technologies (Cergy-Pontoise, France). Confluent myoblasts were differentiated into myotubes in DMEM supplemented with 2 mM glutamine, 5% horse serum, 2% penicillin/streptomycin (5000 U) (Differentiation medium, DM). After 5-7 days in DM, spinal cord explants were added on the cultured contracting muscle cells. After co-culture with spinal cord, the culture was kept in DM. All co-cultures were fed three times a week and examined daily under a phase-contrast inverted microscope to follow the appearance of the innervation.

To evaluate the Ca²⁺ dependency, extracellular Ca²⁺ chelator EGTA (5 µM) (Sigma) and cell-permeable Ca²⁺ chelator BAPTA-AM (10 µM) (Invitrogen Life Technologies) was added to the culture. The role of the key signaling enzyme CaMKII was achieved by the treatment of cocultures by inhibitor, KN-93 (10 µM) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA).

Stimulation of the NMDARs was achieved by exposing cells to 100 µM NMDA, as previously described (Biondi et al., 2010). To evaluate the CREB dependency, KG-501 (10 µM, Sigma) was added to the culture. After 5 days of treatment, explants were mechanically removed from the muscle layer, and proteins were purified and analyzed by western blot as described below.

Human primary culture of myogenic precursor cells from SMA patients biopsies. Muscle biopsies were obtained from the BTR (Bank of Tissues for Research, a partner in the EU network EuroBioBank) in accordance with European recommendations and French legislation. Satellite cells were isolated from biopsies and cultivated as described previously (Bigot et al., 2009) in growth medium

consisting of 1 vol 199 Medium / 4 vol DMEM (Invitrogen Life Technologies) supplemented with 20% fetal calf serum (Invitrogen Life Technologies), 2.5 ng/ml hepatocyte growth factor (HGF) (Invitrogen Life Technologies), and 50 µg/ml Gentamycin (Invitrogen Life Technologies). Since Gentamycin can enhance SMN expression by itself (Heier and DiDonato, 2009), the same medium was dispatched in treated or untreated culture to ensure the same exposure to the drug. Further expansion was made in growth medium without HGF. The myogenic purity of the populations was monitored by immunocytochemistry using desmin as a marker. Differentiation was induced at confluence by replacing the growth medium with DMEM supplemented with 4% horse serum and 50 µg/ml of gentamycin (Sigma). Blockade of MEK phosphorylation was achieved using 10 µM of U0126 (Sigma), 20 minutes per day, during 5 days.

Slice preparation. Control and SMA-like mice at 2 days of age were anesthetized with an intraperitoneal injection of 0.1 ml of pentobarbital (20 mM). An intracardiac perfusion was performed using ice-cold low-Na⁺ Ringer, containing : KCl 3 mM, NaH₂PO₄ 1.25 mM, sucrose 230 mM, NaHCO₃ 26 mM, CaCl₂ 0.8 mM, MgCl₂ 8 mM, glucose 25 mM, ascorbic acid 0.4 mM, and kynurenic acid 1 mM, and bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂, pH 7.4. After decapitation the laminectomy was performed at 4°C in the same solution. After sectioning the roots, the spinal cord was transferred into a 2% agar solution at 38°C. Then, the solution was cooled to 4°C and the agar block containing the spinal cord was cut and glued in the chamber of a slicer (Leica S100V). The slices were 300 µm thick. The slices were transferred into Ringer at 34°C for 30 min and then brought to room temperature.

Calcium imaging. Motor neurons were identified using an upright microscope (Axioscop, Zeiss, Germany) with Nomarski differential interference contrast (DIC) optics, a 60X Olympus objective, 0.90 NA water immersion objective, and a 0.63 NA condenser. Motor neurons were maintained under voltage clamp in the whole-cell recording (WCR) configuration at a holding potential of -70 mV. The intracellular solution contained (in mM) 140 K-gluconate, 5.4 KCl, 4.1 MgCl₂, 9.9 HEPES-K, 0.36 Na-GTP, 4 Na-ATP and 0.1 Oregon Green 488 BAPTA-1 (Molecular Probes Europe, Amsterdam, The Netherlands). Tight-seal WCRs were obtained with borosilicate pipettes (4 - 6 MΩ) from superficial somata using an EPC-9 amplifier (HEKA Elektronik, Darmstadt, Germany). Series resistance values ranged from 15 to 25 MΩ and were compensated for by 60%. Currents were filtered at 1.3 kHz and sampled at a rate of 250 µsec/point. Digital fluorescence images were obtained using an excitation-acquisition system from T.I.L.L. Photonics (Planegg, Germany). Briefly, to excite fluorescence of the Ca²⁺ dye OG1, light from a 75W Xe lamp was focused on a scanning monochromator set at 488 nm and coupled, by a quartz fibre and a lens, to the microscope, equipped with a dichroic mirror and a high-pass emission filter centered at 505 and 507 nm, respectively. Images were acquired by a Peltier-cooled CCD camera (IMAGO QE; 1376 × 1040 pixels; pixel size: 244 nm after 63X magnification and 2 × 2 binning).

Histological and immunohistochemical analysis. Spinal cords were dissected and incubated overnight in 4% PFA PBS solution, and washed twice for 2 h with PBS. The lumbar spinal cords (L1 to L5) were embedded in 4% Agarose solution in sterilized water for 30 min at 4°C. 50 µm sections were then performed using a vibratome on the whole length of the sample. One out of every five sections was processed for immunohistochemical analysis. Tissue sections were incubated for 1 h at room temperature in a blocking solution (10% normal donkey serum with 1% Triton X-100 and 0.5% Tween in Tris Buffer Solution (TBS)). Motor neuron and Gemini of coiled bodies immunodetection were performed using a polyclonal goat

anti-choline acetyltransferase (ChAT) primary antibody (1 : 400; Chemicon, Inc., Temecula, CA) and a monoclonal mouse anti-SMN primary antibody (1 : 200; BD Transduction Laboratories, Lexington, KY) for 4 days at 4°C in 3.5% donkey serum with 0.1% Tween TBS. Sections were washed between each subsequent step with 0.1% Tween in TBS. Sections were subsequently incubated with polyclonal CyTM3-conjugated Donkey anti-Goat antibodies (1 : 400; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and polyclonal CyTM2-conjugated Donkey anti-Mouse antibodies (1 : 400; Jackson ImmunoResearch) for 1 h at room temperature in 3.5% donkey serum with 0.1% Tween TBS. The sections were washed three times for 10 min in 0.1% Tween TBS and mounted in Fluoromount GTM (SouthernBiotech, Birmingham, AL) mounting medium. The staining specificity was checked in control incubations performed in the absence of the primary antibody.

All counts were performed using ImageJ software v1.37 (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Color images were tinted using Image Pro-Plus software, where identical brightness, contrast, and color balance adjustments were applied to all groups.

Microscopy. All immunofluorescence images were collected with a CCD camera (QImaging Retiga 2000R Fast, Cooled Mono 12 bit) mounted on Olympus microscope (BX51) using the Image Pro-Plus v6.0 software (MediaCybernetics Inc., Bethesda, MD) with x40 (4X Olympus objective UPlan FL N 0.13), 100 (10X Olympus objective UPlan FL N 0.3), 200 (20X Olympus objective FL N 0.5), 400 (40X Olympus objective UPlan FL N 0.75), 600 (60X Olympus objective UPlanS Apo 1.35 oil) and 1000 (100X Olympus objective UPlanS Apo 1.4 oil) magnifications.

Protein and western blot analysis. The ventral part of frozen spinal cord was separated from dorsal one by razor blade at -20 ° C. A furrow still appears in the middle of the ventral part and dorsal root ganglia are visible on the dorsal part of the spinal cord. Brain, heart, kidney, lung, liver, diaphragm, *tibialis* muscle and ventral lumbar spinal cord samples (2 to 5 mg) were homogenized in 100 µl/5 mg tissues in the presence of ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris HCl pH=8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP40, 5 mM EDTA pH 8.0, 2 mM PMSF (phenyl-methylsulfonyl fluoride, Sigma-Aldrich), 50 µg/ml leupeptin, 50 µg/ml pepstatin A and 50 µg/ml aprotinin). Protein concentration of the clarified homogenates (4°C, 15 min, 13,500 rev.min⁻¹) was determined on all samples using the Bradford protein assay (Biorad Laboratories, CA). 10 µg protein samples for SMN analysis and 30 µg samples for other analysis of each homogenate were submitted to 12.5% SDS-PAGE electrophoresis (1.5 M Tris pH 8.3, 12.5% Acrylamide, 0.07% Bis, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.06% TEMED). The separated proteins were transferred on PVDF membranes (Biorad) (Towbin et al., 1984). Equal loading of samples was checked by Ponceau dye staining of the transferred gels. Western blot analysis was performed on membranes incubated overnight at 4°C in 4% BSA, 0.1% TWEEN 20, TBS pH 7.4. Each of the following primary antibodies, including monoclonal mouse anti-SMN (1 : 5,000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), polyclonal rabbit anti-Thr305 phospho-CaMKII (1 : 1000; Chemicon), polyclonal rabbit anti-Ser⁴⁷³ phospho-AKT (1 : 1000; Cell signaling Technology, Inc, Boston, MA), polyclonal rabbit anti phospho-ERK1/2 (1 : 500; Cell Signaling, Inc.), polyclonal rabbit anti-Ser¹³³ phospho-CREB (1 : 1,000; Millipore), monoclonal mouse anti-Ser¹⁸³ phospho-Elk-1 (1 : 1,000; Santa Cruz Biotechnology, Inc) was incubated overnight at 4°C in the above blocking medium. Membranes were rinsed in 0.1% TWEEN 20 in TBS for 3 x 10 min at room temperature and then incubated in horseradish peroxidase-conjugated Goat secondary antibody directed against Mouse Immunoglobulins (1 : 5,000; Biorad Laboratories, CA) and in horseradish peroxidase-

conjugated Goat secondary antibody directed against rabbit Immunoglobulins (1 : 10,000; Jackson ImmunoResearch) in 0.1% TWEEN 20 in TBS for 1h at room temperature. Bound antibody complexes were developed using the ECL system (Amersham Biotech., Saclay, France) and exposed to hyperfilm ECL-plus X ray film (Amersham Biotech.).

In some instances, membranes were stripped after immunoblotting with phospho-CaMKII, phospho-AKT, phospho-ERK1/2, phospho-CREB and phospho-Elk-1 by incubation in stripping buffer (100 mM β-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7) for 30 min at 55°C with agitation, and membranes were then blocked and reprobed with polyclonal rabbit anti-CaMKII (1 : 1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc), polyclonal rabbit anti-AKT (1 : 1,000; Cell Signaling, Inc.), polyclonal rabbit anti-ERK1/2 (1 : 500; Cell Signaling, Inc.), polyclonal rabbit anti-CREB (1 : 1,000; Millipore), monoclonal mouse anti-Elk-1 (1 : 1,000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and monoclonal mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antibody (GAPDH) (1 : 5,000; Chemicon). Films were quantified with ImageJ v1.37 and the results reported as means ± SEM.

Chromatin immunoprecipitation. Ventral lumbar Spinal Cord samples were chopped into small pieces with a scalpel and were fixed for 15 min with 1% formaldehyde. Tissues were washed 3 times in cold PBS containing protease inhibitors (2 mM PMSF, 50 µg/ml leupeptin, 50 µg/ml pepstatin A and 50 µg/ml aprotinin) and collected by centrifugation. Cells were pelleted by centrifugation and resuspended in 300 µl of 85 mM KCl, 0.5% NP-40, 5 mM piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES) pH 8.0 in the presence of protease inhibitors (2 mM PMSF, 50 µg/ml leupeptin, 50 µg/ml pepstatin A and 50 µg/ml aprotinin). After incubation on ice for 10 min, cells were sonicated 6 times for 30 sec using Bioruptor (Diagenode, Philadelphia, PA). Lysates were cleared by centrifugation and DNA concentration was determined by nanodrop spectrophotometer. ChIP-Adembeads (Ademtech SA, Pessac, France) were incubated for 15 min at room temperature with blocking buffer on a rotating wheel. Beads were resuspended in 125 µl of ChIP Dilution buffer (0.01% SDS, 1% Triton X100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl (pH 8.1)), and after a 1h incubation, equal amounts of DNA diluted 10 times in dilution buffer were added. DNA was incubated overnight at 4°C on a rotating wheel with 1 µg of the following antibodies: polyclonal rabbit anti-Ser¹³³ phospho-CREB (Millipore), monoclonal mouse anti-Ser¹⁸³ phospho-Elk-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc), polyclonal rabbit anti-acetyl-Histone H3 Lys9 (Millipore) and polyclonal rabbit-acetyl-Histone H4 Lys8 (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY). Beads were washed sequentially in 150 mM NaCl TSE (0.1% SDS, 1% Triton X100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) with 500 mM NaCl TSE, buffer A (0.25 M LiCl, 1% NP-40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-Hcl (pH 8.1)), and 2 times with Tris-EDTA (pH 8.1) and then selectively eluted with 200 µl 1% SDS and 0.1 M NaHCO₃. Cross-links were reversed by heating at 65°C for 4 h after adding NaCl at a 200 mM final concentration. After treatment with proteinase K (50µg/ml) for 1 h at 37°C, DNA was purified using GeneClean Turbo Kit (Q-Biogene, MP Biomedicals, Illkirch, France). Real time PCR analysis of inputs or immunoprecipitated DNAs was performed.

Quantitative real time PCR analysis. Ventral lumbar Spinal Cord samples were chopped into small pieces with a scalpel and RNA was extracted using Trizol (Invitrogen). Each RNA preparation was treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega). One microgram was reverse transcribed with random primers (Promega) and reverse transcriptase M-MLV-RT (Invitrogen).

Quantitative real time PCR was performed with standard protocols using SYBR®Green ROX Mix (ABgene, Courtaboeuf, France) as a fluorescent detection

dye in ABI PRISM® 7000 in a final volume of 10 µl which also contains 300 nM of the following primers (Operon, Cologne, Germany) : SMN2 Exon 4-Exon 5 segment F : 5'-TGTGTTGTGGTTTACTACTGG-3'; SMN2 Exon 4-Exon 5 segment R : 5'-TATTTCCAGGAGACCTGGAG-3'; SMN2 Exon 7-Exon 8 segment F : 5'-AAAAAGAAGGAAGGTGCTCAC-3'; SMN2 Exon 7-Exon 8 segment R : 5'-GCCTCACCACCGTGCTGG-3'; 18S F : 5'-GTAACCCGTGAACCCATT-3'; 18S R : 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'; SMN2 promoter site 1 [-2667nu to -2401nu] F : 5'-GAGAGAGTTCCAGGAGTCAA-3'; SMN2 promoter site 1 [-2667nu to -2401nu] R : 5'-GTCTCAAACCTCGGTTGCTT-3'; SMN2 promoter site 2 [+160nu to +503nu] F : 5'-TCGTAGAAAGCGTGAGAAGT-3'; SMN2 promoter site 2 [+160nu to +503nu] R : 5'-AAAACGCGGACCACAAC-3'. The relative amounts of DNA in samples were determined on the basis of the threshold cycle for each PCR product (Ct).

Statistical analysis. All values are displayed as means and standard error of the mean (SEM) within each group (Systat v 8.0, SPSS Inc., Chicago, IL). Statistical analysis was performed and comparison between groups were done using ANOVA and post-hoc test LSD. Survival analysis was performed using Kaplan-Meier analysis.

RESULTS

The inhibition of the MEK/ERK/Elk-1 pathway by U0126 promoted SMN expression in the spinal cord of type 1 SMA-like mice and in myotubes from severe type SMA patients.

Sustained activation of ERK1/2 correlated with low SMN expression level in SMA spinal cord (Biondi et al., 2010). To test the assumption of a causal link between the ERK pathway activation and the SMN expression levels, we analyzed the effects of ERK in vivo inhibition in SMA spinal cord. For this purpose, a population of type 1 SMA-like mice was treated daily from birth by intrathecal injection of U0126 (1 mg/kg per day), a MAPK Kinase (MEK) inhibitor leading to ERK inhibition (Supplemental Fig. 1A and B). We found that this in vivo ERK inhibition resulted in a significant increase in SMN protein concentration in the spinal cord of type 1 SMA-like mice (Fig. 1A and 1B). The U0126-induced increase of SMN expression proved to be tissue-dependent (Fig. 1C and 1D). The SMN level remained constant during the treatment period. These data are further substantiated by the significant increase of gemini of coiled bodies (gems) in the motor neuron nuclei of U0126-treated SMA-like mice (Fig. 1E, 1F, 1G, 1H and 1I).

Consistent with our findings in SMA-like mice, the inhibition of the ERK pathway by U0126 in myotube culture of paravertebral muscles from type 2 SMA patients resulted in a significant SMN expression increase (Fig. 1J and 1K). To determine whether these effects of ERK inhibition occurred at all stages of muscle differentiation, we analyzed SMN expression in myoblasts (Fig. 1L and 1M). No ERK inhibition-induced effect was apparent in myoblasts suggesting that the positive regulatory effect of ERK inhibition on AKT and SMN is restricted to differentiated muscle cells, accounting for previous studies indicating differentiation stage-specific crosstalks between ERK and AKT in muscle cells (Rommel et al., 1999; Zimmermann and Moelling, 1999).

To determine whether the increased SMN protein level resulted from an activation of SMN2 gene expression and/or from a modulation of the exon-7 insertion in the SMN transcripts, we quantified the fraction of exon-7-containing mRNA inside the population of SMN transcripts using real-time RT-PCR aimed at amplifying either the exon7-exon8 segment (E7-E8) or the exon 4-exon 5 segment (E4- E5) in the lumbar spinal cord of vehicle- and U0126-treated control and SMA-like mice at 2 days of age (Fig. 1N and 1O). Expectedly, SMA-like mice showed a dramatic reduction (more than 74% reduction) in

exon-7-containing SMN transcripts compared to control mice. As early as 2 hours following U0126 treatment, a significant 2.5-fold increase in SMN2 gene expression in the SMA-like mice was recorded. The inclusion profile of exon-7 in SMN transcripts kept unmodified suggesting that this ERK-mediated inhibitory effect occurred at the transcriptional level. This global activation of SMN2 gene transcription led to an increase from 26% to 65% of exon-7-containing SMN transcripts in U0126-treated SMA spinal cord. In addition, the 2-hours delay between the U0126 treatment and the SMN2 gene transcriptional activation suggested that the ERK inhibition effects occurred directly, without any additional transcription event.

The MEK/ERK/Elk-1 and the PI3K/AKT/CREB signaling pathways are in competition for SMN2 gene regulation in the spinal cord of type 1 SMA-like mice.

Since these data suggested for the first time that the ERK pathway might have a crucial role in the regulation of SMN expression, we analyzed the effects of ERK inhibition at the level of SMN gene promoter. Interestingly, when we analyzed the sequence of the human SMN promoter (GenBank accession AF187725), we found that several CREB binding sites were flanked by putative response elements for Elk-1 a transcription factor of the ETS family, known to be a direct target of ERK (Whitmarsh et al., 1995; Yang et al., 1999; Zhang et al., 2008). These sites include response elements for Elk-1 itself or for the Elk-1-containing Serum Response Factor (SRF). More precisely, the CREB binding site 2 (+244 to +248 bp), considered as a positive regulator of SMN gene expression (Majumder et al., 2004) is flanked by putative response elements for Elk-1 and SRF (+356 to +429 bp) (Fig. 2B). We identified an additional putative CRE site (referred to as site 1) that includes two potential CREB binding sites (-2572 to -2569 bp and -2525 to -2522 bp) and also two potential SRF binding sites (-2556 to -2548 bp) (Fig. 2A). We performed ChIP experiments aimed at evaluating the respective binding of CREB and Elk-1 to these two sites. We have initially analysed the activation profile of the two transcription factors, namely Elk-1 and CREB, in the spinal cord of vehicle- and U0126-treated type 1 SMA-like mice and controls. Elk-1 was found over-activated in the spinal cord of type 1 SMA-like mice (Fig. 2C and 2D), as expected for a direct target of ERK, contrasting with CREB down-activation (Fig. 2E and 2F). The U0126-treatment induced a marked increase in CREB activation in SMA spinal cord (Fig. 2E and 2F) and a parallel decrease of Elk-1 activation level only in SMA spinal cord (Fig. 2C and 2D). We found that the two transcription factors effectively bind the two Elk-1/CREB binding sites but with an efficiency that correlated with their activation levels. Elk-1 displayed an increased binding on the two sites in SMA spinal cord compared to controls (Fig. 2G and 2H). In contrast, ChIP experiments revealed a dramatic decrease in the binding of CREB on its two specific sites in SMA spinal cord (Fig. 2I and 2J). Interestingly, the CREB vs Elk-1 binding ratio to their respective sites was completely reversed in SMA spinal cords after ERK pathway inhibition by U0126 (Fig. 2G, 2H, 2I and 2J).

We then questioned whether Elk-1 might play a repressive role on SMN2 gene expression. We used ChIP analysis for the determination of histones H3 and H4 acetylation level on the two Elk-1/CREB binding sites in the spinal cord of SMA-like and control mice. Elk-1 recruitment to the two sites correlated to a marked decrease of H3 and H4 acetylation, compared to controls, whereas CREB recruitment, following U0126 treatment, induced a marked increase of H3 and H4 acetylation (Fig. 3A, 3B, 3C and 3D). Taken together, these unexpected results suggest that the ERK/Elk-1 pathway activation results in the repression of SMN2 gene expression in SMA spinal cord. Moreover, the ERK inhibition-induced activation of CREB in SMA spinal cord is likely to act

synergistically with the Elk-1 inhibition leading to an increased overall SMN gene expression.

CaMKII constitutes the molecular basis for ERK and AKT crosstalk in SMA spinal cord.

The fact that ERK inhibition induced CREB activation prompted us to analyze the activation profile of AKT, which is considered as an efficient CREB activating kinase in SMA spinal cord (Biondi et al., 2010). We found that the ERK inhibition resulted in a significant activation of AKT in the spinal cord of SMA-like mice (Fig. 4A and 4B) as well as in human myotubes from SMA patients (Fig. 4C and 4D). An AKT-induced inhibition of ERK has already been described (Majumder et al., 2004; Millino et al., 2009). Yet, a possible involvement of ERK activation level in the control of AKT activation was totally unexpected. Among the possible mechanisms involved in this new crosstalk, CaMKII represented an attractive candidate since 1) in all likelihood, it is situated upstream of ERK and AKT in the signaling cascades (Sutton and Chandler, 2002) and 2) its pattern of activation parallels AKT activation pattern in SMA spinal cord (Biondi et al., 2010). Thus, we have investigated whether the signal generated by ERK inhibition could result in the activation of CaMKII, AKT and ultimately CREB. The *in vivo* inhibition of CaMKII in control and SMA spinal cord by KN-93 abolished the ERK-inhibition-induced activation of CREB (Fig. 4E and 4F). We next investigated the kinetics of CaMKII, AKT and CREB activation following *in vivo* ERK inhibition in control and SMA-like mice (Fig. 4G, 4H, 4I, 4J, 4K, 4L, 4M and 4N). 30 minutes after ERK inhibition, CaMKII and AKT were already activated and the signal is transmitted to CREB 60 minutes after ERK inhibition. These data suggested that the crosstalk between ERK and AKT pathways was direct and independent of any additional transcription event. Taken together, all these data suggest that, at the intracellular level, the transduction signal could shift from a signaling pathway to the other by targeting of a common controlling kinase such as CaMKII, situated upstream of ERK and AKT.

The ERK inhibition induces a calcium flux in SMA spinal cord.

We next questioned whether the ERK inhibition-induced activation of CaMKII was a consequence of an increased calcium influx. To directly address this question, we used an *in vitro* protocol, based on the co-culture of spinal cord explants collected from type 1 SMA-like and control embryos (E10.5) grown on a mono-layer of contractile muscle fibers, as previously described (Biondi et al., 2010). We first ascertained that the U0126-treatment of the co-cultures induced a strong increase (2 fold) in SMN protein expression in the SMA explants (Fig. 5C and 5D). The same effects were observed in control explants albeit to a lower magnitude (Fig. 5A and 5B). We then analyzed the effects of calcium influx blocking. Chelating extracellular Ca^{2+} by EGTA, or intracellular Ca^{2+} by the cell-permeable Ca^{2+} chelator BAPTA-AM, completely blocked both the U0126-induced increase of SMN protein expression (Fig. 5A, 5B, 5C and 5D), CaMKII activation (Fig. 5E, 5F, 5G and 5H) and CREB activation (Fig. 5I, 5J, 5K and 5L) in control and SMA explants. Taken as a whole, these data suggest that the ERK inhibition-induced activation of CaMKII was calcium influx-dependent.

To get closer insight in a direct involvement of Ca^{2+} in these ERK-inhibition-induced effects, neurons located in the ventral motor column of the lumbar spinal cord in control and SMA-like mice were loaded with the Ca^{2+} indicator Oregon green-1 BAPTA through the whole-cell configuration of the patch-clamp technique in living spinal cord sections. Ca^{2+} fluctuations were monitored 30 min after probe loading, while the Ca^{2+} fluorescence has reached a plateau. The cells were then submitted to U0126 for 45 min. Addition of U0126 (10 μM) to the bathing medium induced a net increase in the cytosolic ($\Delta\text{F}/\text{F}_0 = 50.75 \pm 16.85\%$, $n = 4$) Ca^{2+} for both strains

(exemplified on Fig. 5M). On the basis of their electrophysiological properties (i.e. capacitance superior to 30 pF and presence of spikes under the cell attached configuration; see Fig. 5 Inset) it can be concluded that the recorded cells are motor neurons. Taken together these data suggest that ERK inhibition induced a raise in Ca^{2+} cytosolic concentration that originates from either a Ca^{2+} entry within the cell or a Ca^{2+} release from internal stores.

The AKT/ERK equilibrium is shifted by reciprocal blockades in SMA spinal cord.

In order to investigate whether the crosstalk at the level of the ERK and AKT kinases are reciprocal, we tested in the co-cultures the effects of CREB inhibition on the ERK/Elk-1 pathway activation profile in controls and in a SMA context in which the AKT pathway was significantly activated through the NMDA-receptor activation. We found that CREB inhibition resulted in the activation of ERK (Fig. 6A and 6B) and Elk-1 (Fig. 6C and 6D) in close agreement with our hypothesis. More surprisingly, the CREB inhibition resulted in a significant inhibition of AKT (Fig. 6E and 6F), suggesting a negative feedback from the transcription factor to its activating kinase. This inhibition correlated to a significant decrease in SMN expression in control and SMA explants (Fig. 6G and 6H). Taken together, these data strongly suggest the existence of a dynamic equilibrium between ERK and AKT pathways in SMA spinal cord. This equilibrium could be shifted by reciprocal blockades, thus opening a promising way for reactivating the AKT/CREB pathway-induced neuroprotection in impaired neurons.

The inhibition of the MEK/ERK/Elk-1 pathway by U0126 limits motor neuron loss and significantly extends lifespan of type 1 SMA-like mice.

Since the ERK inhibition is likely to activate SMN expression in SMA motor neurons, we questioned whether this effect could be beneficial in protecting motor neurons from cell death. To this end, we compared the number of ChAT-positive motor-neurons in the ventral spinal cord of control mice and vehicle- or U0126-treated SMA-like mice (Fig. 7A, 7B, 7C, 7D, 7E, 7F and 7G). At 2 days of age, a 31.37% loss of motor neurons was observed in the vehicle-treated type 1 SMA-like mice in comparison to untreated P2 controls (Fig. 7H). In contrast, U0126-treated type 1 SMA-like mice only display 11.84% reduction in the number of motor neurons at 2 days of age. At 6 days of age a 15.36 % reduction was observed in U0126-treated SMA-like mice compared to controls, demonstrating that the ERK inhibition significantly limited the extent of motor neuron death ($p < 0.05$). Furthermore, motor-neuron cell-body-area evaluation provided evidence for a persistent atrophy of motor neurons in the ventral horn of the spinal cord of the vehicle-treated type 1 SMA-like mice compared to control mice at 2 days of age (Fig. 7I). In contrast, the extent of atrophy is significantly limited in U0126-treated mice ($p < 0.05$) (Fig. 7J). No difference could be observed in the number of motor neurons in U0126- and vehicle-treated control mice at the same age (Fig. 7I and 7J).

Finally, *in vivo* ERK inhibition by U0126 resulted in a significant improvement in the phenotype and survival of severe SMA-like mice compared to vehicle-treated counterparts. The mean survival increased from 1.66 ± 0.55 days for the vehicle-treated SMA-like mice to 4.73 ± 1.30 days for the U0126-treated mice (Fig. 7K), representing a 2.8-fold increase in lifespan ($p < 0.001$). In addition, the U0126 treatment led to a significant and progressive increase in the body weight of SMA-like mice, until death (Fig. 7L). Importantly, ERK inhibition significantly improved motor capacities of SMA-like mice as evidenced by the ability of U0126-treated, in contrast to vehicle-treated SMA-like mice, to get back on their feet after being placed on their side (Fig. 7M). In addition, the spontaneous activity and the mobility of SMA-like mice significantly increased with U0126 treatment as evidenced by the open field test (Fig. 7N and 7O).

The inhibition of the MEK/ERK/Elk-1 pathway by Selumetinib, a clinically applicable drug, is remarkably beneficial for type 1 SMA-like mice.

These results prompted us to test whether a clinically applicable MEK inhibitor could provide the same effects of U0126 on both the SMN expression and the lifespan of type 1 SMA-like mice. We chose to test a new drug, Selumetinib (AZD6244), a MEK inhibitor leading to ERK inhibition (Supplemental Fig. 1C) which is currently in phase II clinical trial (Board et al., 2009), successfully tested in the Pediatric Preclinical Testing program (Kolb et al., 2010). Expectedly, oral Selumetinib treatment (5 mg/Kg per day) mimics the effects of U0126 administration. ERK inhibition by Selumetinib results in a significant enhancement of SMN expression in the spinal cord of SMA-like mice (Fig. 8A and 8B). As found following U0126 treatment, the Selumetinib-induced increase in SMN expression proved to be tissue-dependent (Fig. 8C and 8D). Furthermore, the treatment resulted in the significant activation of AKT (Fig. 8E and 8F).

Most importantly, the Selumetinib treatment significantly increased the survival of type 1 SMA-like mice compared to vehicle-treated SMA-like mice (Fig. 8G). The mean survival increased from 1.54 ± 0.66 days for the vehicle-treated mice to 5.36 ± 1.60 days for the Selumetinib-treated mice, representing a 3.4-fold increase in lifespan ($p < 0.001$). Finally, the Selumetinib treatment led to a significant increase in the body weight of type 1 SMA-like mice, until death (Fig. 8H).

DISCUSSION

The present study provides the first lines of evidence that the drug inhibition of the MEK/ERK/Elk-1 signaling pathway could be beneficial for severe types of SMA. The ERK inhibition resulted in the activation of the AKT/CREB pathway leading to a significant increase in the lifespan of type 1 SMA-like mice, treated in the symptomatic phase of the disease. A 3-fold increase in lifespan was recorded with this treatment which correlates with a significant neuroprotection in the spinal motor neurons. Importantly, the ERK inhibition induces a marked increase in the concentration of SMN in SMA motor neurons. Furthermore, the role of ERK inhibition on the SMN protein expression has been confirmed in human differentiated muscle cells derived from severe SMA patients.

While the AKT/CREB pathway is largely considered as beneficial for neurons, notably in a neuro-degenerative context (van der Heide et al., 2006; Lunn et al., 2009; Jimenez et al., 2011), the role of the ERK/Elk-1 pathway in determining the fate of neurons is more contrasted and seems to vary according to the neuronal injury model (Maiese et al., 1993; Ueda et al., 1996; Meyer-Franke et al., 1998; Cha et al., 2000; Colucci-D'Amato et al., 2003; Cheung et al., 2004). Few studies have addressed the role of the ERK pathway in motor neurons in normal or pathological contexts (Hollis et al., 2009). Our present data suggest that, in the specific context of SMA, the ERK/Elk-1 pathway, which is constitutively over-activated in SMA spinal cord (Biondi et al., 2010), exerts a repressive role in SMN2 gene transcription therefore likely participating in SMA pathogenesis. Although Elk-1 was generally known as a transactivating factor notably through the constitution of the SRF complex (Gille et al., 1995), a repressive role for Elk-1 has been already reported, in some uncommon circumstances (Besnard et al., 2011). Nevertheless, in the spinal cord of type 1 SMA-like mice, the fixation of Elk-1 on its two tested response elements situated in the SMN2 gene promoter was correlated with site-specific histone deacetylations that encompass neighbor response elements for CREB. CREB is considered as the main transactivating factor for SMN gene transcription (Majumder et al., 2004). Accordingly, inhibiting Elk-1 phosphorylation through MEK/ERK pathway inhibition

resulted in the significant increase in acetylation of the two sites, including the CREB response elements. When CREB is activated in SMA spinal cord, as it is the case following ERK-inhibition, the binding of CREB to its response elements is significantly increased, and correlates with an increase in histone acetylation. In SMA motor neurons these molecular events at the level of the SMN2 gene promoter correlated with a significant increase in SMN expression which is likely to result from SMN2 gene transcriptional activation. According to this hypothesis, kinetic analyses revealed that ERK inhibition resulted in CREB activation within the hour, leading to a rapid SMN2 gene activation that can be detected as early as 2 hours after ERK inhibition. This cascade of molecular events likely resulted in an acute SMN increase in expression explaining why the SMN level did not progressively increase with treatment. All these data suggest that Elk-1 and CREB compete for the same sites leading to the recruitment of either a repressive or an activatory transcription complex. Importantly, in human SMA myotubes, ERK inhibition correlated also with a significant increase of SMN expression. In addition to SMN2 gene transcriptional activation, an increase in SMN transcript stability following ERK inhibition cannot be excluded on the basis of our data. Yet, the activation of another Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK), the P38 MAPK, was shown to efficiently stabilize SMN transcripts through RNA binding protein HuR (Farooq et al., 2009).

Unexpectedly, the role of Elk-1 in repressing SMN gene expression proved to be restricted to SMA tissues. Indeed, the Elk-1 deprivation in neuronal cell culture resulted in a significant decrease in SMN expression (Demir et al., 2011) and the present data revealed that, in control spinal cords, ERK inhibition resulted also in an increase in SMN expression independently of Elk-1 activation profile (Fig. 1A and 1B; Fig. 2C and 2D). This discrepancy in ERK-inhibition response in control and SMA tissues may result from the likely alteration of a number of signaling pathways in SMA tissues (Millino et al., 2009), among which some might converge to transcription factors such as Elk-1 or CREB.

Moreover, our data suggest the hypothesis of a dynamic equilibrium between the MEK/ERK/Elk-1 and AKT/CREB pathways in SMA spinal and muscle cells that can be shifted by reciprocal blockade. While ERK and AKT signaling pathways are often simultaneously activated in response to growth factors and hormones (Katz and McCormick, 1997; Rodriguez-Viciana et al., 1997), and are thought to synergize to provide a more robust signal (Rommel et al., 1999; von Gise et al., 2001), putative negative crosstalks among those resulting in the control of neuron survival (Subramanian et al., 2005) or of muscle differentiation (Rommel et al., 1999) have been proposed. In such cases, AKT pathway activation induced ERK pathway inhibition. The present study provides the first line of evidence of an ERK-dependent inhibition of the AKT/CREB pathway in the spinal cord. Using inhibitors at different levels of each signaling cascade, we reported here that the crosstalk between ERK and AKT pathways are sequential and reciprocal in SMA spinal and muscle cells. Furthermore, our data suggested that the signal could shift to a parallel pathway when an intermediary molecule, situated downstream as the transcription factor such as CREB in the AKT pathway, is inhibited. In that case, similar to what has been described for key enzymes of the metabolic pathways, there is first a negative feedback event, the upstream intermediary (e.g. AKT), being deactivated and, secondly, a shift to a parallel signaling pathway (e.g. ERK) through the activation of an upstream molecule. Accordingly, inhibiting ERK would sequentially result in AKT and CREB activations, thus increasing SMN expression that would ultimately suggest a beneficial use of ERK inhibition for SMA treatment.

Although the mechanisms involved in ERK-dependent inhibition of the AKT pathway require further

investigation, the present data unexpectedly suggest an ERK-dependent inhibition of intracellular calcium influx. Inhibiting ERK rapidly resulted in an important calcium influx in the cytoplasm of spinal neurons, which share common electrophysiological properties with motor neurons. This ERK-inhibition induced-calcium influx appeared significantly higher in SMA neurons compared to control cells, strengthening the hypothesis of a sustained blockade of the ERK-dependent calcium channels in SMA spinal cord in which ERK is constitutively over-activated (Biondi et al., 2010). This observation could provide additional clues for explaining the reduced frequency of local Ca²⁺ transients observed in cultured (Smn)-deficient motor neurons (Jablonka et al., 2007). In addition, the crucial role of the calcium influx in ERK-inhibition induced intracellular signaling was further evidenced by the effects of the calcium chelation that completely abolished the shift toward the AKT pathway, and the consecutive SMN expression increase in SMA spinal cord. The relevant calcium channels, the opening of which is under the control of ERK, have yet to be identified. Nevertheless, the present data led us to speculate that, in the specific context of SMA, the constitutive over-activation of the ERK pathway might participate in the alteration of Ca²⁺ homeostasis, as reported in the nerve terminal of another severe type SMA-like mouse model (Ruiz et al., 2010).

The time course of the ERK to AKT shift strongly suggested that the interconnection between ERK and AKT pathways is unlikely to include an additional transcription step. Furthermore, the molecule responsible for the shift has to be dependent on Ca²⁺ for its activation and situated upstream of ERK and AKT in each signaling pathway. CaMKII, which is directly involved in AKT activation following ERK inhibition (Fig. 4), might be this dual specificity key controlling molecule. CaMKs belong to a well-known calcium-signal-decoding kinase family that is able to transduce the signal from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of some intermediary kinases such as ERK or AKT or transcription factors such as CREB or Elk-1 (Johnson et al., 1997; Lee et al., 2004). The signaling cascades initiated by CaMK activation are likely to occur in a cell-dependent manner (Johnson et al., 1997). Very few studies have been devoted to the signaling pathway that is situated downstream CaMKII in the ventral spinal cord (Wan and Poo, 1999). The present data suggest that, in the spinal motor columns, decoding the calcium signal involves the sequential activation of CaMKII, AKT and finally CREB. Inhibiting one of the kinases in this pathway would impair the activation of the transcription factor, and, ultimately, the increase in SMN2 gene expression.

Finally, in the light of all these results, it is tempting to speculate that, in SMA motor neurons and myotubes, the low activity of the motor system, associated with the intracellular sustained level of ERK activation, would lower the cytoplasmic concentration of Ca²⁺ and consequently the activation profile of Ca²⁺-dependent signaling kinases such as CaMKII and their respective downstream signaling cascades involving AKT and CREB. The fact that, in control spinal cord, chelating intracellular Ca²⁺ by BAPTA-AM induced a significant decrease in SMN expression (Fig. 5), suggests that, even in normal conditions, a threshold intracellular Ca²⁺ concentration is essential for keeping SMN expression at a constant level. Accordingly, inducing an intracellular Ca²⁺ influx in SMA motor neurons or myotubes, through either an increase in neuron activity with physical exercise, or more directly through the activation of cell surface calcium channels such as the NMDA receptor (Biondi et al., 2010), activates CaMKII resulting in both the activation of AKT and inhibition of ERK. One consequence of the latter signaling event would be the de-inhibition of several hitherto unidentified calcium channels ultimately leading to synergistic increase in the Ca²⁺ influx (Fig. 9).

Most importantly, all these data strengthen the assumption that the drug inhibition of the ERK pathway

would constitute a means of increasing SMN expression in the spinal cord of severe SMA types. Our study used the well-established severe SMA mouse model (Monani et al., 2000) that has been treated in the symptomatic phase of the disease as indicated for humans. Interestingly, analyzing the effects of ERK inhibition in mouse models of milder SMA type will be useful in benchmarking against other known inhibitors. Importantly, we tested the effects of two different ERK inhibitors both administered by intrathecal injections or per os with identical results. Among those, we tested Selumetinib (AZD6244) from Selleck medical. This drug, orally administered, has little secondary effects and is already in phase II clinical trial for the treatment of specific cancers (Board et al., 2009). Selumetinib would constitute a bona fide candidate molecule to be tested on symptomatic type 1 SMA patients.

REFERENCES

- Avila AM, Burnett BG, Taye AA, Gabanella F, Knight MA, Hartenstein P, Cizman Z, Di Prospero NA, Pellizzoni L, Fischbeck KH, Sumner CJ (2007) Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 117:659-671.
- Besnard A, Galan-Rodriguez B, Vanhoutte P, Caboche J (2011) Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. *Front Neurosci* 5:35.
- Bigot A, Klein AF, Gasnier E, Jacquemin V, Ravassard P, Butler-Browne G, Mouly V, Furling D (2009) Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells. *Am J Pathol* 174:1435-1442.
- Biondi O, Branchu J, Sanchez G, Lancelin C, Deforges S, Lopes P, Pariset C, Lecolle S, Cote J, Chanoine C, Charbonnier F (2010) In vivo NMDA receptor activation accelerates motor unit maturation, protects spinal motor neurons, and enhances SMN2 gene expression in severe spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 30:11288-11299.
- Board RE, Ellison G, Orr MC, Kemsley KR, McWalter G, Blockley LY, Dearden SP, Morris C, Ranson M, Cantarini MV, Dive C, Hughes A (2009) Detection of BRAF mutations in the tumour and serum of patients enrolled in the AZD6244 (ARRY-142886) advanced melanoma phase II study. *Br J Cancer* 101:1724-1730.
- Butchbach ME, Singh J, Thorsteinsdottir M, Saieva L, Slominski E, Thurmond J, Andersson T, Zhang J, Edwards JD, Simard LR, Pellizzoni L, Jarecki J, Burghes AH, Gurney ME (2010) Effects of 2,4-diaminoquinazoline derivatives on SMN expression and phenotype in a mouse model for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 19:454-467.
- Cha YK, Kim YH, Ahn YH, Koh JY (2000) Epidermal growth factor induces oxidative neuronal injury in cortical culture. *J Neurochem* 75:298-303.
- Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, Wang NM, Tsai CH, Li H (2001) Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9808-9813.
- Cheung NS, Koh CH, Bay BH, Qi RZ, Choy MS, Li QT, Wong KP, Whiteman M (2004) Chronic exposure to U18666A induces apoptosis in cultured murine cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 315:408-417.
- Colucci-D'Amato L, Perrone-Capano C, di Porzio U (2003) Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases. *Bioessays* 25:1085-1095.
- Crawford TO, Pardo CA (1996) The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* 3:97-110.
- Demir O, Aysit N, Onder Z, Turkel N, Ozturk G, Sharrocks AD, Kurnaz IA (2011) ETS-domain transcription factor Elk-1 mediates neuronal survival: SMN as a potential target. *Biochim Biophys Acta* 1812:652-662.
- Denton CL, Gustafson DL (2011) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of AZD6244 (ARRY-142886) in tumor-bearing nude mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 67:349-360.
- Farooq F, Balabanian S, Liu X, Holcik M, MacKenzie A (2009) p38 Mitogen-activated protein kinase stabilizes SMN mRNA through RNA binding protein HuR. *Hum Mol Genet* 18:4035-4045.
- Gille H, Strahl T, Shaw PE (1995) Activation of ternary complex factor Elk-1 by stress-activated protein kinases. *Curr Biol* 5:1191-1200.
- Heier CR, DiDonato CJ (2009) Translational readthrough by the aminoglycoside geneticin (G418) modulates SMN stability in vitro and improves motor function in SMA mice in vivo. *Hum Mol Genet* 18:1310-1322.
- Hollis ER, 2nd, Jamshidi P, Low K, Blesch A, Tuszyński MH (2009) Induction of corticospinal regeneration by lentiviral trkB-induced ERK activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7215-7220.
- Jablonka S, Beck M, Lechner BD, Mayer C, Sendtner M (2007) Defective Ca²⁺ channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* 179:139-149.
- Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J (2011) Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (Aβeta) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-alpha (sAPP(alpha)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* 286:18414-18425.
- Johnson CM, Hill CS, Chawla S, Treisman R, Bading H (1997) Calcium controls gene expression via three distinct pathways that can function independently of the Ras/mitogen-activated protein kinases (ERKs) signaling cascade. *J Neurosci* 17:6189-6202.
- Katz ME, McCormick F (1997) Signal transduction from multiple Ras effectors. *Curr Opin Genet Dev* 7:75-79.
- Kobayashi T, Askanas V, Engel WK (1987) Human muscle cultured in monolayer and cocultured with fetal rat spinal cord: importance of dorsal root ganglia for achieving successful functional innervation. *J Neurosci* 7:3131-3141.
- Kolb EA, Gorlick R, Houghton PJ, Morton CL, Neale G, Keir ST, Carol H, Lock R, Phelps D, Kang MH, Reynolds CP, Maris JM, Billups C, Smith MA (2010)

- Initial testing (stage 1) of AZD6244 (ARRY-142886) by the Pediatric Preclinical Testing Program. *Pediatr Blood Cancer* 55:668-677.
- Lee SJ, Campomanes CR, Sikat PT, Greenfield AT, Allen PB, McEwen BS (2004) Estrogen induces phosphorylation of cyclic AMP response element binding (pCREB) in primary hippocampal cells in a time-dependent manner. *Neuroscience* 124:549-560.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlot P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80:155-165.
- Lorson CL, Androphy EJ (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet* 9:259-265.
- Lorson CL, Rindt H, Shababi M (2010) Spinal muscular atrophy: mechanisms and therapeutic strategies. *Hum Mol Genet* 19:R111-118.
- Lunn JS, Sakowski SA, Kim B, Rosenberg AA, Feldman EL (2009) Vascular endothelial growth factor prevents G93A-SOD1-induced motor neuron degeneration. *Dev Neurobiol* 69:871-884.
- Maiese K, Boniece IR, Skurat K, Wagner JA (1993) Protein kinases modulate the sensitivity of hippocampal neurons to nitric oxide toxicity and anoxia. *J Neurosci Res* 36:77-87.
- Majumder S, Varadharaj S, Ghoshal K, Monani U, Burghes AH, Jacob ST (2004) Identification of a novel cyclic AMP-response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene. *J Biol Chem* 279:14803-14811.
- Mercuri E et al. (2007) Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neurology* 68:51-55.
- Meyer-Franke A, Wilkinson GA, Kruttgen A, Hu M, Munro E, Hanson MG, Jr., Reichardt LF, Barres BA (1998) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* 21:681-693.
- Millino C, Fanin M, Vettori A, Laveder P, Mostacciolo ML, Angelini C, Lanfranchi G (2009) Different atrophy-hypertrophy transcription pathways in muscles affected by severe and mild spinal muscular atrophy. *BMC Med* 7:14.
- Monani UR, Sendtner M, Covert DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossoll W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*(^{-/-}) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 9:333-339.
- Rodriguez-Viciana P, Wame PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, Das P, Waterfield MD, Ridley A, Downward J (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 89:457-467.
- Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nunez L, Rossman R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD, Glass DJ (1999) Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 286:1738-1741.
- Ruiz R, Casanas JJ, Torres-Benito L, Cano R, Tabares L (2010) Altered intracellular Ca²⁺ homeostasis in nerve terminals of severe spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 30:849-857.
- Subramanian C, Opipari AW, Jr., Castle VP, Kwok RP (2005) Histone deacetylase inhibition induces apoptosis in neuroblastoma. *Cell Cycle* 4:1741-1743.
- Sutton G, Chandler LJ (2002) Activity-dependent NMDA receptor-mediated activation of protein kinase B/Akt in cortical neuronal cultures. *J Neurochem* 82:1097-1105.
- Swoboda KJ, Scott CB, Reyna SP, Prior TW, LaSalle B, Sorenson SL, Wood J, Acsadi G, Crawford TO, Kissel JT, Krossschell KJ, D'Anjou G, Bromberg MB, Schroth MK, Chan GM, Elsheikh B, Simard LR (2009) Phase II open label study of valproic acid in spinal muscular atrophy. *PLoS One* 4:e5268.
- Swoboda KJ, Scott CB, Crawford TO, Simard LR, Reyna SP, Krossschell KJ, Acsadi G, Elsheikh B, Schroth MK, D'Anjou G, LaSalle B, Prior TW, Sorenson SL, Maczulski JA, Bromberg MB, Chan GM, Kissel JT (2010) SMA CARNIVAL trial part I: double-blind, randomized, placebo-controlled trial of L-carnitine and valproic acid in spinal muscular atrophy. *PLoS One* 5:e12140.
- Thurmond J, Butchbach ME, Palomo M, Pease B, Rao M, Bedell L, Keyvan M, Pai G, Mishra R, Haraldsson M, Andresson T, Bragason G, Thosteinsdottir M, Bjornsson JM, Covert DD, Burghes AH, Gurney ME, Singh J (2008) Synthesis and biological evaluation of novel 2,4-diaminoquinazoline derivatives as SMN2 promoter activators for the potential treatment of spinal muscular atrophy. *J Med Chem* 51:449-469.
- Towbin H, Schoenenberger C, Ball R, Braun DG, Rosenfelder G (1984) Glycosphingolipid-blotting: an immunological detection procedure after separation by thin layer chromatography. *J Immunol Methods* 72:471-479.
- Tsai LK, Tsai MS, Ting CH, Li H (2008) Multiple therapeutic effects of valproic acid in spinal muscular atrophy model mice. *J Mol Med (Berl)* 86:1243-1254.
- Ueda K, Yagami T, Kageyama H, Kawasaki K (1996) Protein kinase inhibitor attenuates apoptotic cell death induced by amyloid beta protein in culture of the rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 203:175-178.
- van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP (2006) Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog Neurobiol* 79:205-221.
- von Gise A, Lorenz P, Wellbrock C, Hemmings B, Berberich-Siebelt F, Rapp UR, Troppmair J (2001) Apoptosis suppression by Raf-1 and MEK1 requires MEK- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signals. *Mol Cell Biol* 21:2324-2336.
- Wan J, Poo M (1999) Activity-induced potentiation of developing neuromuscular synapses. *Science* 285:1725-1728.
- Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ (1995) Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* 269:403-407.
- Yang SH, Shore P, Willingham N, Lakey JH, Sharrocks AD (1999) The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *Embo J* 18:5666-5674.
- Zhang HM, Li L, Papadopolou N, Hodgson G, Evans E, Galbraith M, Dear M, Vougie S, Saxton J, Shaw PE (2008) Mitogen-induced recruitment of ERK and MSK to SRE promoter complexes by ternary complex factor Elk-1. *Nucleic Acids Res* 36:2594-2607.
- Zimmermann S, Moelling K (1999) Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 286:1741-1744.

FIGURES LEGENDS

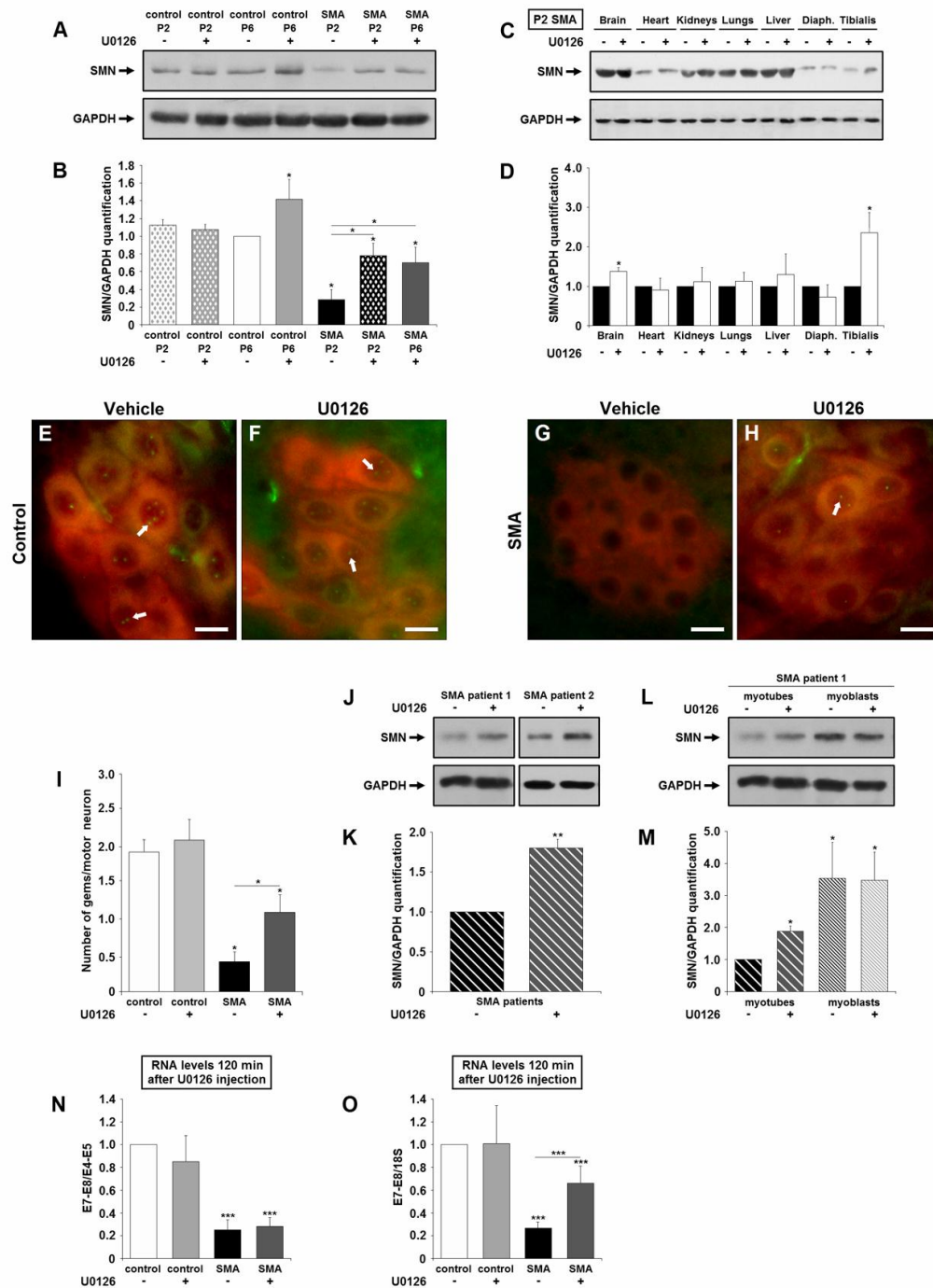


FIGURE 1: ERK pathway inhibition by U0126 induces a remarkable increase in SMN expression in the motor neurons of severe SMA-like mice and in myogenic cells of severe type SMA patients.

A and B. Western blot analysis and quantification of SMN protein expression in the ventral lumbar spinal cord of vehicle- and U0126-treated control mice at 2 and 6 days of age, of vehicle-treated SMA-like mice at 2 days of age and U0126-treated SMA-like mice at 2 and 6 days of age (n=3). **C and D.** Western blot analysis and quantification of SMN protein expression in brain, heart, kidneys, lungs, liver, diaphragm and *tibialis* of U0126-treated SMA-like mice at 2 days of age (n=3). **E-I.** Immunodetection of gems in ChAT-positive motor-neurons in the lumbar spinal cord (L1-L5) of vehicle- (**E**) and U0126-treated control mice (**F**) at 6 days of age, vehicle-treated SMA-like mice at 2 days of age (**G**) and U0126-treated SMA-like mice at 6 days of age (**H**) (scale bar : 25 μ m). Quantitative analysis of gems per motor neuron (**I**). **J and K.** Western blot analysis and quantification of SMN protein expression in vehicle- and U0126-treated human SMA cultured myotubes from two type 2 SMA patients (n=3 each patient). **L and M.** Western blot analysis and quantification of SMN protein expression in vehicle- and U0126-treated human SMA cultured myotubes and myoblasts from a type 2 SMA patient (n=3). **N and O.** Quantification by real time RT PCR of exon 7-exon 8 (E7-E8)-segment containing SMN transcripts normalized either by exon 4-exon 5 (E4-E5)-segment containing SMN transcripts (**N**) or by 18S transcripts (**O**) in the ventral lumbar spinal cord of vehicle- and U0126-treated control and SMA-like mice at 2 days of age (n=9). Data are displayed as mean \pm SEM. (*, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001)

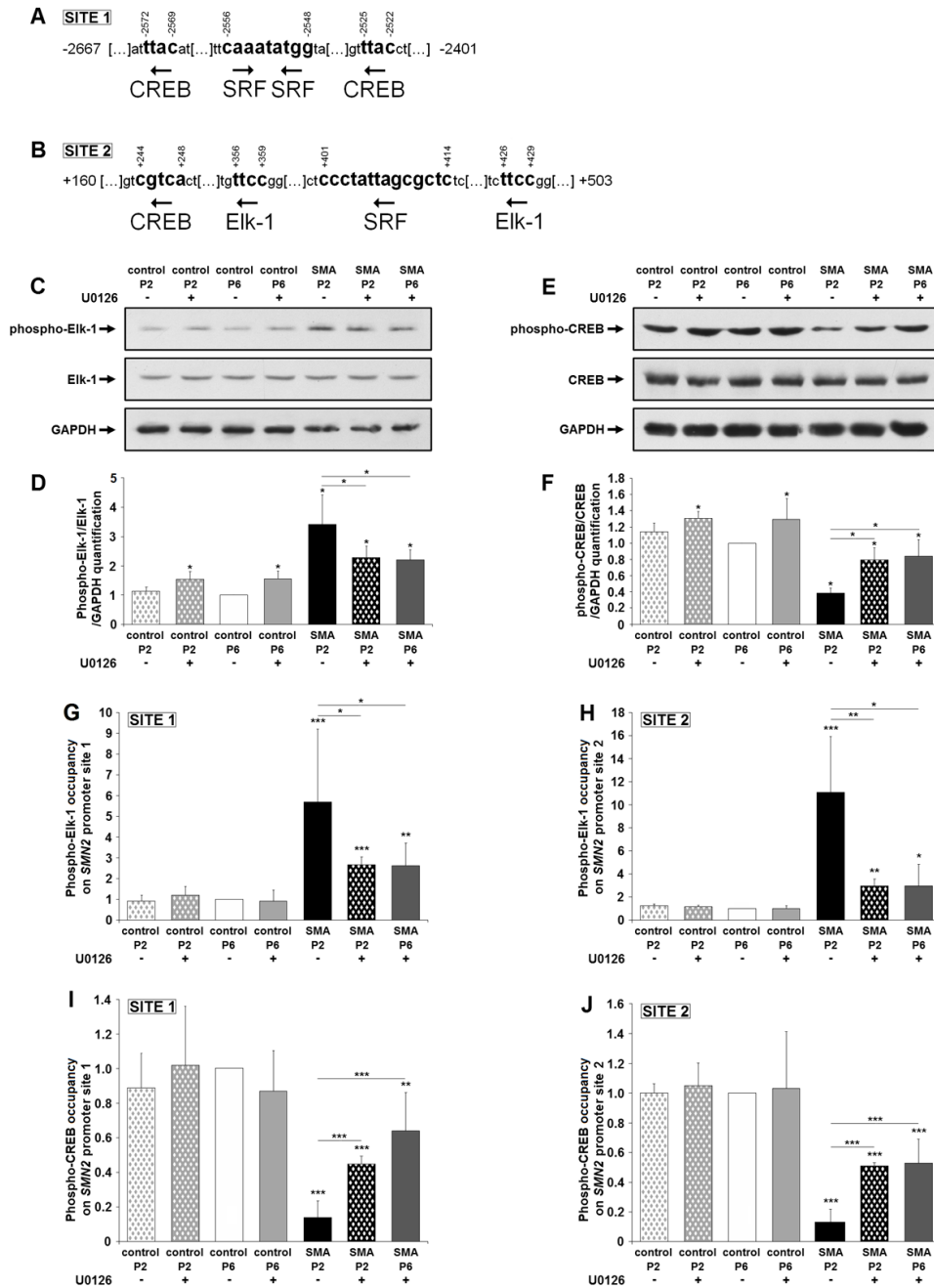


FIGURE 2: Activated Elk-1 and CREB transcription factors compete for binding the SMN2 promoter in the spinal cord of severe SMA-like mice.

A and B. SMN promoter site 1 (**A**) and site 2 (**B**) sequences. **C-F.** Western blot analysis and quantification of Elk-1 protein (**C and D**) phosphorylation and CREB protein (**E and F**) phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of vehicle- and U0126-treated control mice at 2 and 6 days of age, of vehicle-treated SMA-like mice at 2 days of age and U0126-treated SMA-like mice at 2 and 6 days of age (n=3). **G-J.** ChIP analysis of Phospho-Elk-1 (**G and H**) and Phospho-CREB (**I and J**) in the ventral lumbar spinal cord of vehicle- and U0126-treated control mice at 2 and 6 days of age, of vehicle-treated SMA-like mice at 2 days of age and U0126-treated SMA-like mice at 2 and 6 days of age (n=9). Quantitative real time PCR was performed to detect SMN2 promoter site 1 (**G and I**) and site 2 (**H and J**). Data are displayed as mean ± SEM. (*, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001).

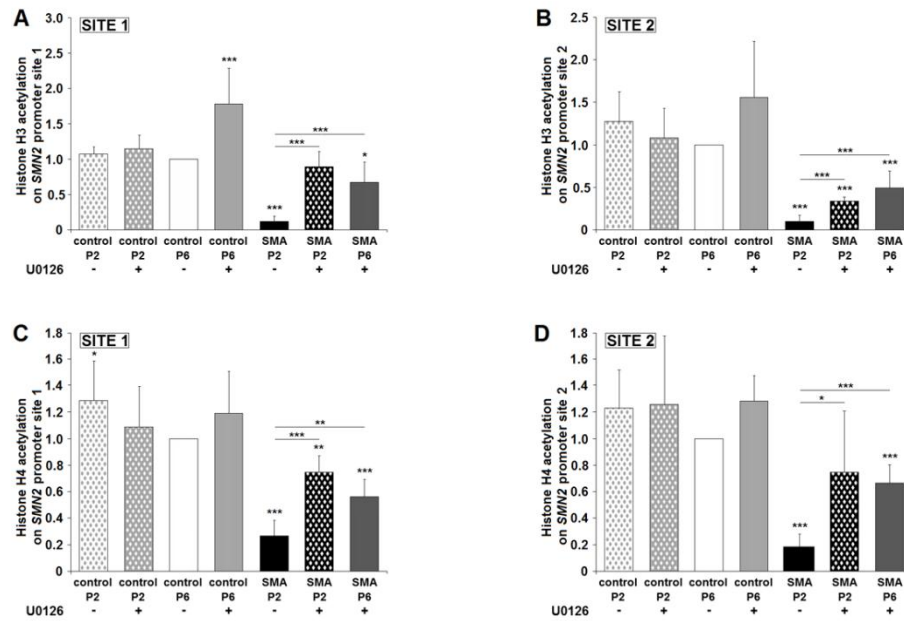


FIGURE 3: ERK pathway inhibition by U0126 alters H3 and H4 acetylation profiles in the spinal cord of severe SMA-like mice.
A-D. ChIP analysis of Histone H3 (**A and B**) and H4 (**C and D**) acetylation in the ventral lumbar spinal cord of vehicle- and U0126-treated control mice at 2 and 6 days of age, of vehicle-treated SMA-like mice at 2 days of age and U0126-treated SMA-like mice at 2 and 6 days of age (n=9). Quantitative real time PCR was performed to detect SMN2 promoter site 1 (**A and C**) and site 2 (**B and D**). Data are displayed as mean \pm SEM. (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$).

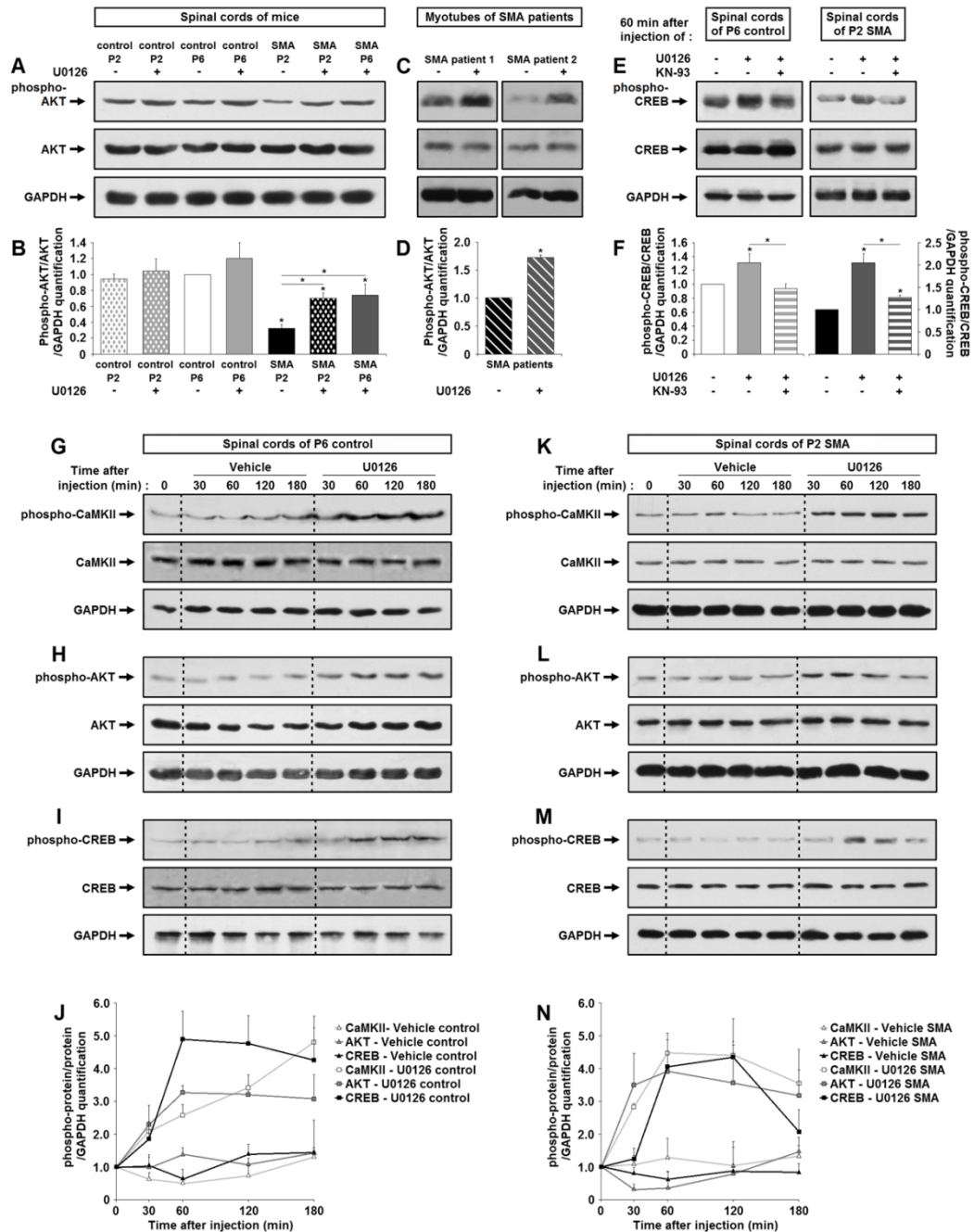


FIGURE 4: ERK pathway inhibition by U0126 leads to CaMKII activation and triggers the AKT/CREB pathway in the spinal cord of SMA-like mice.

A-D. Western blot analysis and quantification of AKT protein in the ventral lumbar spinal cord of vehicle- and U0126-treated control mice at 2 and 6 days of age, of vehicle-treated SMA-like mice at 2 days of age and U0126-treated SMA-like mice at 2 and 6 days of age (**A and B**) (n=3) and in vehicle- and U0126-treated human SMA cultured myotubes from 2 type 2 SMA patients (**C and D**) (n=3). **E and F.** Western blot analysis and quantification of CREB protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of control mice at 6 days of age and SMA-like mice at 2 days of age, treated by vehicle, ERK inhibitor U0126 with or without CaMKII inhibitor KN-93 (n=3). **G-J.** Kinetic analysis by Western blot of CaMKII protein activation (**G**), AKT protein activation (**H**) and CREB protein activation (**I**) following in vivo ERK inhibition by U0126 in spinal cords of control mice at 6 days of age and quantifications (n=2) (**J**). **K-N.** Kinetic analysis by Western blot of CaMKII protein activation (**K**), AKT protein activation (**L**) and CREB protein activation (**M**) following in vivo ERK inhibition by U0126 in spinal cords of SMA-like mice at 2 days of age and quantifications (n=2) (**N**). Data are displayed as mean \pm SEM. (*, p<0.05).

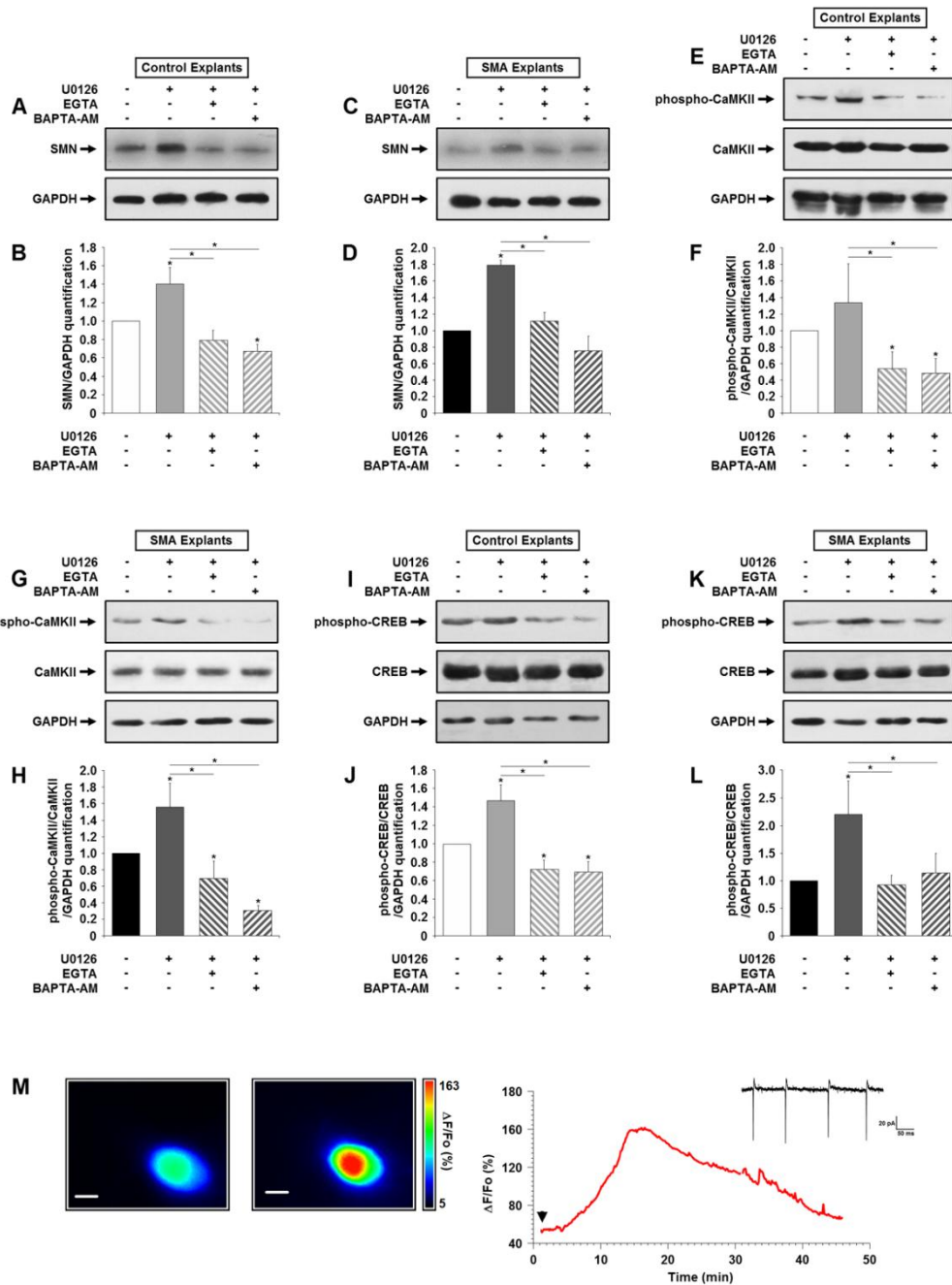


FIGURE 5: The alteration of intracellular pathways induced by ERK pathway inhibition is Ca²⁺ influx dependent.

A-D. Western blot analysis and quantification of SMN protein expression in control (A and B) and SMA (C and D) spinal cord explants in presence or absence of U0126 or the Calcium chelators EGTA and BAPTA-AM (n=3). E-H. Western blot analysis and quantification of CaMKII protein phosphorylation in control (E and F) and SMA (G and H) spinal cord explants in presence or absence of U0126 or either the Calcium chelators EGTA and BAPTA-AM (n=3). I-L. Western blot analysis and quantification of CREB protein phosphorylation in control (I and J) and SMA (K and L) spinal cord explants in presence or absence of U0126 or either the Calcium chelators EGTA and BAPTA-AM (n=3). M. Time course of the U0126 effect on an Oregon green Bapta-1-loaded motor neurons recorded in spinal cord section of a control mouse. Images represent either the basal fluorescence level (left side) or the fluorescence at the peak of the response (right side) (scale bar : 20 μ m). Inset shows spikes recorded on the same cell under the cell attached- configuration of the patch-clamp. Data are displayed as mean \pm SEM. (*, p<0.05).

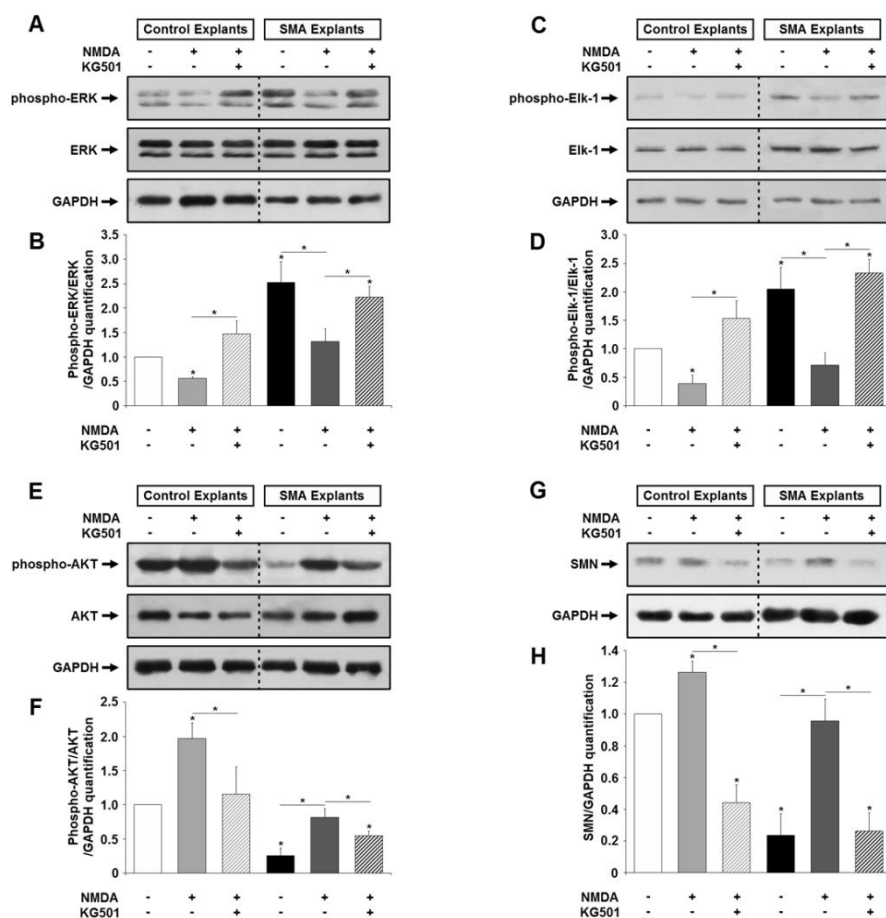


FIGURE 6: The crosstalk between ERK and AKT signaling pathways is reciprocal in SMA spinal cord.

A and B. Western blot analysis and quantification of ERK protein phosphorylation in control and SMA spinal cord explants in presence or absence of either NMDA or the CREB inhibitor KG501 (n=3). **C and D.** Western blot analysis and quantification of Elk-1 protein phosphorylation in control and SMA spinal cord explants in presence or not of NMDA and of the CREB inhibitor KG501 (n=3). **E and F.** Western blot analysis and quantification of AKT protein phosphorylation in control and SMA spinal cord explants in presence or absence of either NMDA or the CREB inhibitor KG501 (n=3). **G and H.** Western blot analysis and quantification of SMN protein expression in control and SMA spinal cord explants in presence or absence of NMDA or the CREB inhibitor KG501 (n=3). Data are displayed as mean \pm SEM. (*, $p < 0.05$).

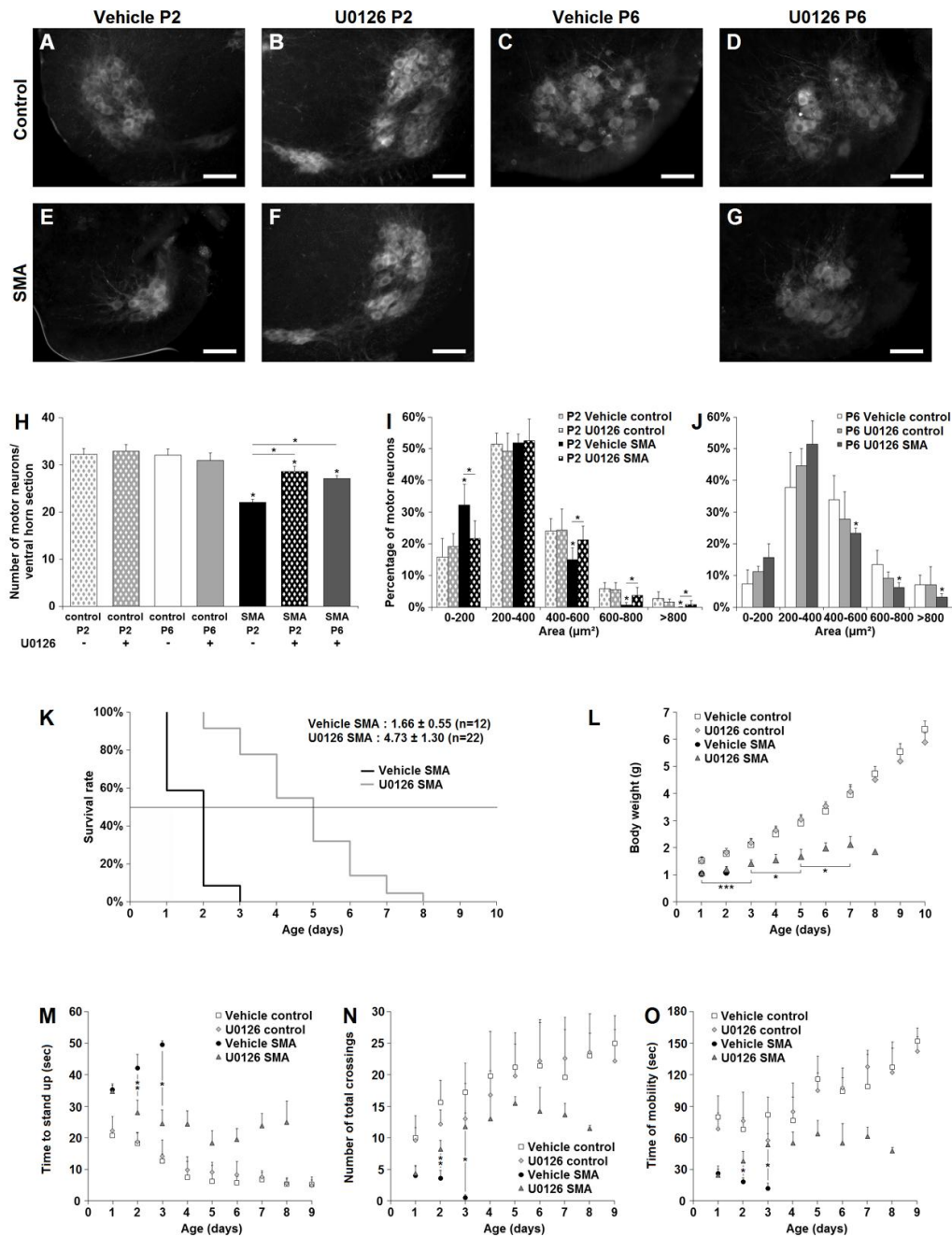


FIGURE 7: Inhibition of ERK pathway by U0126 induces a significant motor-neuron protection, increases life span and improves weight curve in severe SMA-like mice.

A-G. Immunodetection of ChAT-positive motor neurons in the lumbar spinal cord (L1-L5) of vehicle- (A) and U0126-treated control mice (B) at 2 days of age, vehicle- (C) and U0126-treated control mice (D) at 6 days of age, vehicle- (E) and U0126-treated SMA-like mice at 2 days of age (F) and U0126-treated SMA-like mice at 6 days of age (G) (scale bar : 100μm). **H, I and J.** Quantitative analysis of the number (H) and the cell body area (I and J) of motor neurons per ventral horn in the ventral lumbar spinal cord of vehicle- and U0126-treated control mice at 2 and 6 days of age, vehicle-treated SMA-like mice at 2 days of age and vehicle- and U0126-treated SMA-like mice at 6 days of age (n=4). **K.** Life span of U0126-treated SMA-like mice (n=22) compared to vehicle-treated SMA-like mice (n=12). **L.** Weight curve in U0126-treated (n=22) and vehicle-treated SMA-like mice (n=12) compared to U0126-treated (n=15) and vehicle-treated control mice (n=15). **M.** time spent to stand up after being placed on the side for vehicle- (n=5) and U0126-treated control mice (n=5) compared to vehicle- (n=5) and U0126-treated SMA-like mice (n=5). **N and O.** Total number of crossings (N) and mobility (O) during 5 min in the open field test for vehicle- (n=5) and U0126-treated control mice (n=5) compared to vehicle- (n=5) and U0126-treated SMA-like mice (n=5). Data are displayed as mean ± SEM. (*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001).

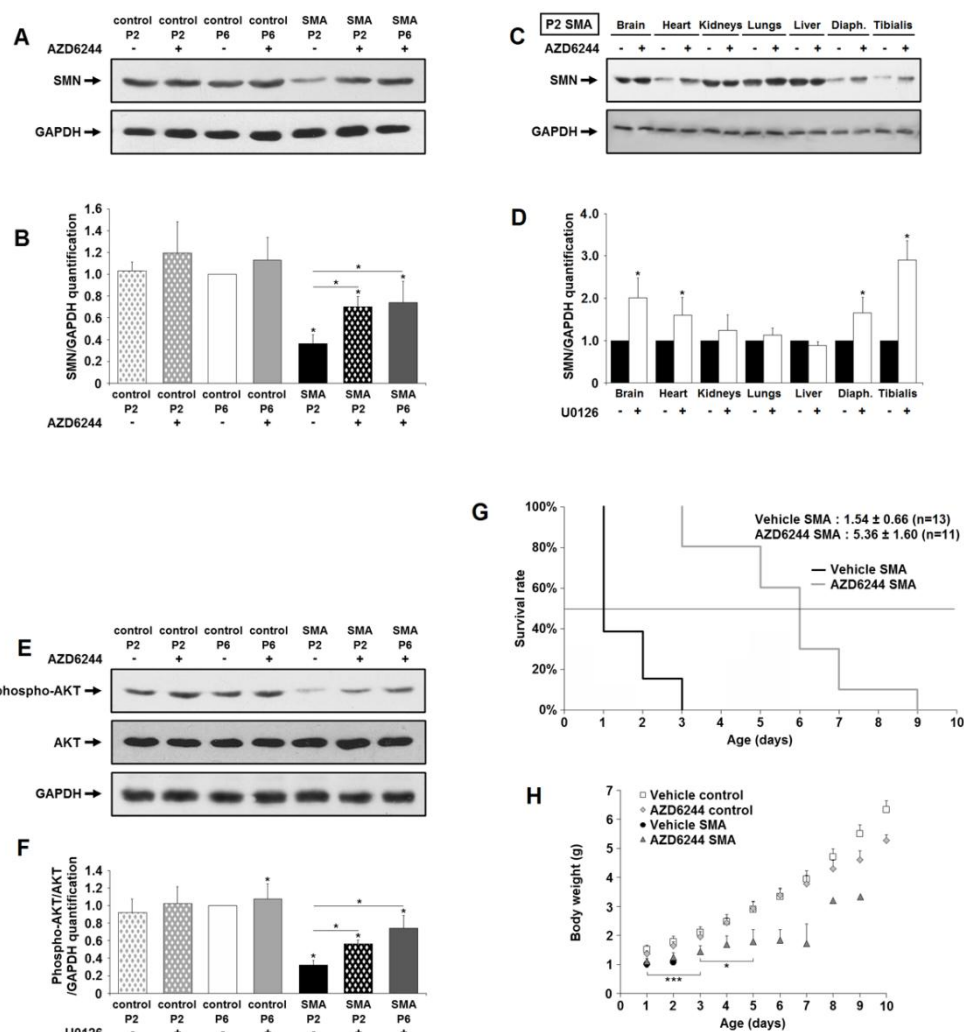


FIGURE 8: Inhibition of ERK pathway by AZD6244 (Selumetinib) significantly enhances SMN expression and AKT activation, increases life span and improves weight curve in severe SMA-like mice.

A and B. Western blot analysis and quantification of SMN protein expression in the ventral lumbar spinal cord of vehicle- and AZD6244-treated control mice at 2 and 6 days of age, vehicle-treated SMA-like mice at 2 days of age and AZD6244-treated SMA-like mice at 2 and 6 days of age (n=3). **C and D.** Western blot analysis and quantification of SMN protein expression in brain, heart, kidneys, lungs, liver, diaphragm and *tibialis* of AZD6244-treated SMA-like mice at 2 days of age (n=3). **E and F.** Western blot analysis and quantification of AKT protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of vehicle- and AZD6244-treated control mice at 2 and 6 days of age, vehicle-treated SMA-like mice at 2 days of age and AZD6244-treated SMA-like mice at 2 and 6 days of age (n=3). **G.** Life span of AZD6244-treated SMA-like mice (n=11) compared to vehicle-treated SMA-like mice (n=13). **H.** Weight curve in AZD6244-treated (n=11) and vehicle-treated SMA-like mice (n=13) compared to AZD6244-treated (n=10) and vehicle-treated control mice (n=10). Data are displayed as mean \pm SEM. (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

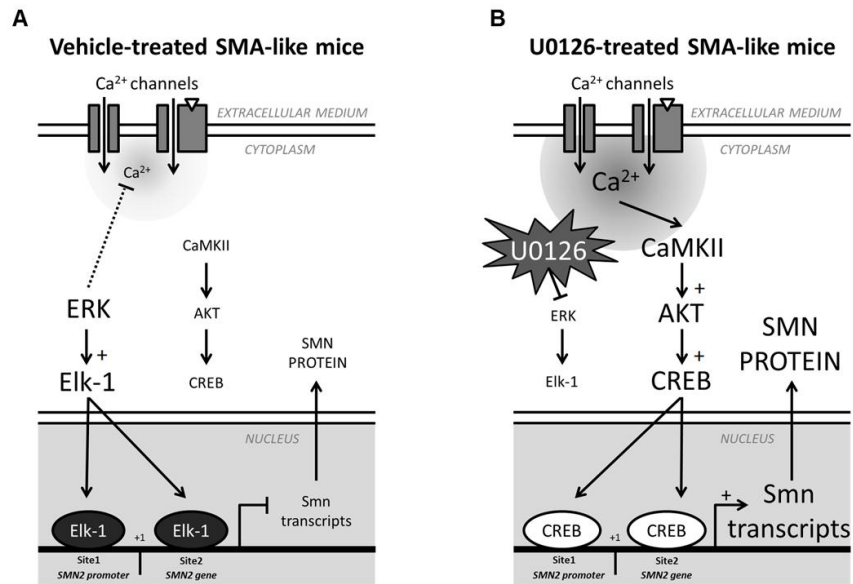


FIGURE 9: Proposed mechanisms involved in the increase of SMN expression induced by ERK inhibition in the spinal cord of severe SMA-like mice.

A. Activation profile of ERK/Elk-1 and AKT/CREB signaling pathways in lumbar spinal cord of vehicle-treated SMA-like mice compared to control. Large characters indicate activated molecules. **B.** Activation profile of ERK/Elk-1 and AKT/CREB signaling pathways in lumbar spinal cord of U0126-treated SMA-like mice compared to vehicle-treated SMA-like mice. Large characters indicate activated molecules.

4.2. Conclusions de l'article 2

Dans cet article, nous avons démontré que l'inhibition de la voie MEK/ERK/Elk-1 pouvait être bénéfique dans un contexte de SMA. Nous avons observé que l'espérance de vie des souris mimant la SMA de type I était rallongée par un traitement intrathecal au U0126. Pendant, une grande partie du traitement ces souris malades ont pris du poids contrairement aux souris traitées avec un placebo. De plus, l'inhibition de ERK permet une augmentation de la mobilité et de l'activité spontanée des souris malades.

Du point de vue cellulaire, nos résultats prouvent que l'inhibition pharmacologique de ERK, durant la phase symptomatique de la maladie chez ces souris, entraîne une neuroprotection des motoneurones spinaux.

Nous avons identifié une relation croisée entre les voies de signalisation MEK/ERK/Elk-1 et AKT/CREB impliquant la modulation, calcium-dépendante, de l'activité de CaMKII. Ainsi, l'inhibition de ERK induit, d'une part, la diminution de la phosphorylation Elk-1 et de sa liaison sur le promoteur de *SMN2*. D'autre part, l'inhibition de ERK, déclenche l'entrée d'un flux calcique dans les 15 minutes suivant le traitement. Celui-ci active CaMKII, 30 minutes après le traitement, qui à son tour réactive la voie AKT/CREB. Lorsque que CREB est phosphorylé, 1 heure environ après le traitement, il se fixe sur le promoteur de *SMN2* et induit l'acétylation des histones H3 et H4 de la chromatine. En conséquence, la transcription du gène *SMN2* et l'expression de la protéine SMN sont largement augmentées suite à une inhibition de ERK. Ce rôle a été, par la suite, confirmé dans des cellules musculaires différenciées provenant de patients atteints de SMA de type II.

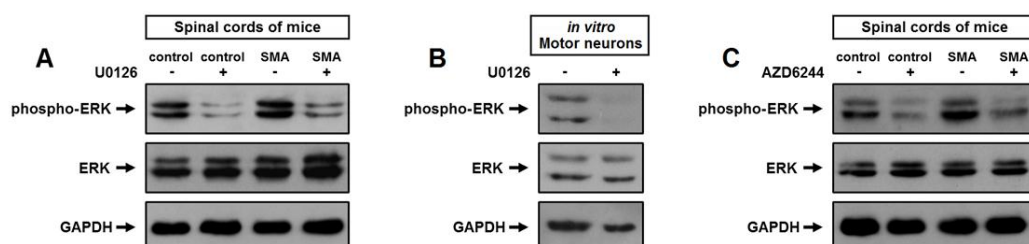
Par ailleurs, nous avons démontré grâce à des inhibitions spécifiques dans les co-cultures que les voies MEK/ERK et AKT/CREB fonctionnaient en balance. En effet, l'inhibition de CREB induit un rétrocontrôle négatif sur la phosphorylation d'AKT et induit l'activation de ERK et de Elk-1.

Nous avons également reproduit l'expérience avec l'AZD6244, un inhibiteur de ERK, actuellement testé dans le cadre de traitement contre le cancer. L'AZD6244, devant être métabolisé, a été administré par voie orale. Ce composé est capable d'allonger la durée de vie des souris mimant la SMA de type I. Tout comme avec le U0126, les souris malades ont pris du poids pendant une grande partie du traitement, contrairement aux souris traitées avec un placebo. De plus ce composé semble avoir une action plus répandue dans l'organisme.

4.3. Résultats complémentaires à l'article 2

4.3.1. Évaluation de l'inhibition de la phosphorylation de ERK par le U0126 et l'AZD6244

Nous avons évalué par western immunoblot le niveau d'inhibition de la phosphorylation de ERK par le U0126 et l'AZD6244 *in vivo* et *in vitro*. Pour ce faire, nous avons traité des souris contrôles et mimant la SMA de type I avec des injections intrathécales de placebo, de U0126 ou d'AZD6244. De même, des motoneurones en culture ont été traités ou non avec de l'U0126 10 μ M dans le milieu de culture.



A. Analyse par western immunoblot de la phosphorylation de la protéine ERK dans la moelle épinière lombaire ventrale de souris contrôles ou mimant la SMA de type I à P2, après un traitement avec un placebo ou du U0126. **B.** Analyse par western immunoblot de la phosphorylation de la protéine ERK dans des motoneurones en culture traités ou non avec du U0126. **C.** Analyse par western immunoblot de la phosphorylation de la protéine ERK dans la moelle épinière lombaire ventrale de souris contrôles ou mimant la SMA de type I à P2, après un traitement avec un placebo ou de l'AZD6244.

Nous avons constaté que le U0126 et l'AZD6244 inhibe environ 75% de la phosphorylation de ERK dans des cellules de la moelle épinière lombaire de souris contrôle et mimant la SMA de type I ou de motoneurones en culture.

5. ARTICLE 3

Reduced IGF-1 signaling protects motor neurons in Spinal-Muscular-Atrophy-like mice

Julien Branchu^{1*}, Olivier Biondi^{1*}, Amina Ben Salah¹, Farah Chali¹, Gabriel Sanchez², Camille Lancelin¹, Céline Desseille¹, Philippe Lopes^{1,3}, Claude Pariset¹, Sylvie Lécolle¹, Jocelyn Côté², Christophe Chanoine¹ et Frédéric Charbonnier¹.

* J.B. and O.B. ont contribué de manière égale à ce travail.

¹ Université Paris Descartes, UFR Biomédicale, Centre d'étude de la sensorimotricité, UMR 8194 CNRS, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France.

² Centre for Neuromuscular Disease and Department of Cellular and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, K1H 8M5 Canada.

³ Université d'Evry-val-d'Essonne, Bd F. Mitterrand, F-91025 Evry, France.

En préparation

5.1. Introduction à l'article 3

Effet de la diminution de IGF-1R dans un contexte de SMA.

L'exercice physique déclenche chez les souris mimant la SMA de type II une augmentation de la durée de vie, une neuroprotection significative des motoneurones lombaires et une augmentation de l'expression de la protéine SMN (Grondard et coll., *J Neurosci*, 2005). Il a été démontré que l'IGF-1 pouvait être un des relais de l'exercice physique dans le cerveau (Carro et coll., *J Neurosci*, 2000; Carro et coll., *J Neurosci*, 2001; Torres Aleman, *Adv Exp Med Biol*, 2005) et la système IGF-1 est perturbé dans un contexte de SMA (Bosch-Marce et coll., *Hum Mol Genet*, 2011; Hua et coll., *Nature*, 2011; Murdocca et coll., *Mol Med*, 2012).

Nous avons démontré que l'exercice physique est également capable de diminuer fortement l'expression du IGF-1R. De plus, cette réduction est corrélée avec une réactivation de la voie AKT/CREB et une inhibition de la voie MEK/ERK/Elk-1. Par conséquent, afin d'étudier le lien fonctionnel entre le niveau d'expression d'IGF-1R et les voies de signalisations intracellulaires déclenchées dans un contexte de SMA, nous avons créé un modèle de souris mimant la SMA de type II et hétérozygote pour *IGF-1R* (*Smn*^{Δ7/Δ7}; *SMN2*^{+/+}; *IGF-1R*^{+/-}) (Hsieh-Li et coll., *Nat Genet*, 2000; Holzenberger et coll., *Nature*, 2003).

Afin d'évaluer l'impact de la diminution *in vivo* des récepteurs à l'IGF-1, nous avons adopté la même approche pluridisciplinaire, associant des analyses comportementales, cellulaires et moléculaires.

Les études comportementales incluaient la mesure de la durée de vie, du poids, de la force et de l'activité spontanée des souris *IGF-1R*^{+/+} et *IGF-1R*^{+/-} mimant la SMA. Les analyses cellulaires se sont basées sur 2 niveaux : celui des motoneurones spinaux et celui des jonctions neuromusculaires. Ainsi nous avons analysé le nombre et la morphologie des motoneurones spinaux à P12. De même, nous avons étudié la morphologie des jonctions neuromusculaires dans trois muscles squelettiques de la patte arrière : un extenseur lent, le *soleus* ; un extenseur rapide, le *plantaris* et un fléchisseur rapide, le *tibialis*.

Nous avons également analysé le niveau d'expression et le profil d'épissage du transgène SMN2 dans la moelle épinière lombaire des souris *IGF-1R*^{+/+} et *IGF-1R*^{+/-} contrôles ou mimant la SMA. Cette analyse a été complétée par l'étude de la liaison des facteurs de transcription Elk-1 et CREB sur le transgène SMN2 et l'étude des voies MEK/ERK/Elk-1, AKT/CREB et JAK/STAT après la diminution d'IGF-1R.

En outre, nous avons évalué l'effet de l'IGF-1 circulant lors d'une surexpression des IGF-1Rs dans des cultures de cellules nerveuses MN1. De même, nous avons analysé les effets d'une déplétion de SMN par des siRNA sur l'expression d'IGF-1R.

C'est le premier article prouvant que la diminution du récepteur à l'IGF-1 peut moduler sélectivement des voies parallèles et être bénéfique dans un contexte de SMA.

Reduced IGF-1 signaling protects motor neurons in Spinal-Muscular-Atrophy-like mice

INTRODUCTION

Spinal Muscular Atrophy (SMA) is a very severe autosomal recessive disease in childhood for which no therapy exists. SMA is characterized by a specific loss of spinal motor neurons leading to a severe muscular weakness and death when vital muscles are affected (Crawford and Pardo, 1996). SMA is caused by mutation of the Survival-of-Motor-Neuron 1 (SMN1) gene (Lefebvre et al., 1995) leading to a deficiency of the survival-motor-neuron (SMN) protein expression. The disease severity is modulated by the expression of SMN2, a SMN1 gene copy, which produces only a small amount of full-length SMN transcripts, due to the alternative splicing of the exon 7, leading, consequently, to a small amount of stable SMN protein (Lorson and Androphy, 2000). Despite nearly two decades of efforts since SMN discovery, it still remains unclear why motor neurons are so sensitive to the deficiency of an ubiquitous expressed protein involved in basic cellular mechanisms such as mRNA metabolism (Kolb et al., 2007) and axonal transport (Rossoll et al., 2003). Micro-arrays analysis unexpectedly failed to identify specific genes, mis-expressed in motor neurons following SMN depletion, and crucial for their survival (Zhang et al., 2008). These data may suggest that the selective degeneration of motor neurons in SMA may result from perturbations that are not restricted to central nervous system but would finally affect motor neurons through a systemic way.

In this context, physical exercise might constitute a means for identifying such pathways. Indeed, regular exercise has been shown to activate efficient protective mechanisms for lumbar motor neurons in a mouse model of severe SMA (Grondard et al., 2005). These beneficial effects partly rely on the NMDA-receptor modulation activity (Biondi et al., 2008). Indeed, Inhibition of NMDA receptors partly reduced the beneficial effects of exercise, suggesting that additional mechanisms are involved in exercise-induced protection for motor neurons. Yet, exercise is well known to modulate a number of neuroprotective signaling pathways, among those one of the most powerful is the Insulin-like Growth Factor (IGF)-1 mediated pathway (Carro et al., 2000; Carro et al., 2001; Gualco et al., 2009). When activated, the IGF-1 receptor (IGF-1R) can trigger several intracellular signaling pathways in neurons, including MEK-ERK1/2, JAK/STAT3 and PI3K-AKT pathways, all being involved in the control of neuron cell survival (Vemuri and McMorris, 1996; D'Mello et al., 1997; Parizas et al., 1997; Crowder and Freeman, 1998; Meyer-Franke et al., 1998; Yadav et al., 2005).

Interestingly, several recent investigations point towards an IGF-1 signaling perturbation in SMA. The level of circulating IGF-1 and IGF-1 hepatic mRNA expression were shown to display marked reduction in severe type SMA model mice (Hua et al., 2011; Murdocca et al., 2012). Furthermore, in the skeletal muscles of SMA patients (Millino et al., 2009) and SMA-like mice (Bosch-Marce et al., 2011), the IGF-1 receptor (IGF-1R) was found over-expressed in SMA muscles and, in human cells, the level of this over-expression correlated with the severity of the disease (Millino et al., 2009). Increasing IGF-1 availability for SMA muscles had no effect on IGF-1R expression (Bosch-Marce et al., 2011), suggesting that IGF-1R overexpression is constitutive and not the result of a compensatory mechanism for the concentration decrease in circulatory IGF-1. Data concerning the IGF-1R expression in SMA central nervous system (CNS) are presently lacking. Interestingly, IGF-1R overexpression was reported in the CNS and muscles of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) (Wilczak et al., 2003; Lunetta et al.,

2012), another fatal motor-neuron disease, without change in IGF-1 concentration in plasma (Wilczak et al., 2003; Corbo et al., 2010). Moreover, recent data demonstrated that the reduction of IGF-1 signaling, through IGF-1R gene partial invalidation (Holzenberger et al., 2003) in a mouse model of Alzheimer disease, resulted in the reduction of behavioral impairment, neuroinflammation, neuronal and synaptic loss (Cohen et al., 2009). Therefore, it seems legitimate to ask whether the activation or the reduction of IGF-1 signaling would be beneficial for SMA motor neurons.

To directly address this question, we generated an SMA mouse model harboring only one allele for IGF-1R (IGF-1R^{+/-}). The present study provides the first experimental lines of evidence indicating that reducing the level of IGF-1R expression 1) is neuroprotective for SMA motor neurons, 2) alters the triggering of intracellular pathways, 3) leads to a remarkable increase of SMN expression in the SMA spinal cord and 4) remarkably improves lifespan and motor behavior of SMA-like mice.

MATERIALS AND METHODS

Mice and treatments. We first crossed *Smn*^{+/ Δ 7} mice with IGF1R^{+/-} mice. We then generated transgenic animals that were *Smn* ^{Δ 7/ Δ 7} SMN2^{+/-} IGF1R^{+/-} by crossing *Smn*^{+/ Δ 7} IGF1R^{+/-} mice (from F1 crossing) with *Smn*^{+/ Δ 7} SMN2^{+/-} mice derive from mice obtained from the Institute of Molecular Biology (Hsieh-Li et al., 2000). These animals developed progressive motor-neuron disease and were termed IGF1R^{+/-} type 2 SMA-like mice. The control mice were always heterozygous knock-out for *Smn* with the human SMN2 transgene.

Male and female IGF1R^{+/-} type 2 SMA-like mice (n= 74), IGF1R^{+/-} type 2 SMA-like mice (n=65), IGF1R^{+/-} control mice (n= 51), IGF1R^{+/-} control mice (n=42) were used for this study. Body weight and lifespan recordings were performed every day until the death of the animal. The animals were considered as dead when mice were no longer able to stand up after having been placed on their sides for 1 min. The care and treatment of animals followed the national authority (Ministère de la Recherche et de la Technologie, France) guidelines for the detention, use and the ethical treatment of laboratory animals.

Training protocol. Exercise was performed in a wheel with a controlled speed as described by Grondard et al. (Grondard et al., 2005). The protocol was started at 8 days of age (P8). The mice in the trained group were progressively accustomed to wheel training for 2 days (the first day, four periods of 5 min running with a rest period of 30 min; the second day, two periods of 10 min running with a rest period of 30 min). Then, the mice were trained continuously, individually for 20 min.day⁻¹. The speed was fixed at 1 m.min⁻¹ for the first 3 days and then increased in steps of 2 m.min⁻¹ to finally reach 5 m.min⁻¹ (maximal speed).

Behavioural evaluation. The grip strength was performed in the forelimb of IGF1R^{+/-} and IGF1R^{+/-} control mice and IGF1R^{+/-} and IGF1R^{+/-} type 2 SMA-like mice from P8 to death. The time spent holding onto a thin metal rod suspended in mid-air was calculated. Each mouse was subjected to five successive attempts separated by a 10 min rest period.

The ambulatory behavior was assessed in an open-field test for all groups. The apparatus consisted in a wooden box measuring 28x28x15 cm. The floor of the arena was divided into 16 7x7 cm squares. The mice were tested individually and the open field was washed after each session. Each mouse initially placed in the center of the open field was allowed to move freely for 5 min. The

behavioral measures recorded manually during these 5 min were the number of peripheral and central square crossings.

Cell cultures and treatments. MN-1 cells, for Motoneuron 1, was derived from the spinal cord of control mice at E18 and was immortalized (Salazar-Gruoso et al., 1991). MN-1 cells were kindly provided by Cote J. and Sanchez G. (Ottawa University, Canada) and were plated at 2000 cells per well in a 6 wells plate with the growing medium Dulbecco Eagle modified (DMEM, Invitrogen, Saint-Aubin, France) supplemented with 10% Foetal Bovin Serum (FBS), 1% of penicillin/streptomycin (P/S) and 0.1% of Fungizone.

For the differentiation, when a 40% confluence were achieved, growing medium was replaced by a differentiation medium of DMEM supplemented with 2% of FBS, 10 ng/ml GDNF (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), 50 μ M of trans-retinol (#R7632; Sigma, resuspended in DMSO to 50 mM), 1% of penicillin/streptomycin (P/S) and 0.1% of Fungizone during 48 hours, as previously described (Hubers et al., 2011).

IGF-1R transfection. When a 50% of confluence were achieved, cells were transfected with 1 μ g of IGF-1R plasmid DNA (ref à voir avec fred) complexed 45 minutes with 6 μ l of Eugene HD (Invitrogen) in 100 μ l of DMEM free of serum, in every single well of the plate. The medium was replaced 24 hours later and supplemented or not with 50 or 100 nM of IGF-1 for 24 hours. Cells were then collected in cold phosphate buffer saline (PBS), centrifuged at 300g during 2 minutes. The cells base was then frozen for biochemical analysis at -80°C.

Transfection of si-RNA. Transient knockdown of SMN expression using RNA interference was performed when a 50% confluence was achieved. ON-TARGETplus siRNA oligonucleotide duplexes were purchased from Thermo Scientific Dharmacon (Thermo Fischer Scientific Inc., MA, USA) for targeting mouse SMN (Targeting: L-044280-00, 5 nmol; non targeting: D-001210-01-20, 20 nmol). Cells were transfected with 50 or 100 pmol of corresponding RNA duplexes using lipofectamine (Invitrogen) diluted in DMEM free of serum and antibiotics, according to manufacturer's instructions. After 4 hours, the growing medium was added and 24 hours later, the medium was replaced. Cells were collected 48 hours later in cold phosphate buffer saline (PBS), centrifuged at 300g during 2 minutes. The cells base was then frozen for biochemical analysis at -80°C.

In situ hybridization. To detect mRNAs for IGF-1-receptor, antisense oligonucleotide probes were synthesized as reported previously (Oshima et al., 2002; Fukaya et al., 2005): Forward 5'-CACAGTCATCCGTGGCTGGA-3' and Reverse 5'-CGTTCCACACACACTTGG-3'. Under deep pentobarbital (40 mg.kg⁻¹) anesthesia, the spinal cord was obtained from P12 SMA-like mice. Frozen sections (14 μ m thickness) were mounted on glass slides coated with 3-aminopropyltriethoxysilane. Each section was fixed immediately after cutting by immersion for 20 minutes in 2% paraformaldehyde in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). Sections were then rinsed three times in PBS, dipped in water and dehydrated with a graded ethanol series (70, 95, 100%). The sections were then air-dried and stored at -80°C until further use. The hybridization cocktail contained 50% formamide, 4X standard saline citrate (SSC), 1X Denhardt's solution, 0.25 mg/ml yeast tRNA, 0.25 mg/ml sheared salmon sperm, 0.25 mg/ml polyA, 10% dextran sulfate, 100 mM DTT and [35S]-dATP-labeled oligonucleotide probes (4.5 x 10⁶ dpm./ml). One hundred microliters of hybridization cocktail was placed on each section. The sections were then covered with a parafilm

coverslip and incubated in a humidified chamber at 43 °C for 20 hours. After hybridization, the sections were washed successively twice in 1X SSC containing 0.01 M DTT and twice in 0.5X SSC containing 0.01 M DTT for 15 minutes at 55 °C and finally in 0.5X SSC containing 0.1 M DTT for 15 minutes at room temperature. Sections were exposed to Nuclear Track emulsion (NTB-2, Kodak) for 8 weeks.

Histological and immunohistochemical analysis. Anesthetized animals were submitted to an intracardial perfusion of 40 ml PBS solution at 1.2 ml.min⁻¹ followed by 40 ml 4% PFA solution diluted in PBS solution at the same flow. Then, spinal cords were dissected and incubated overnight in 4% PFA solution, and washed twice for 2 h with PBS. The lumbar spinal cords (L1 to L5) were embedded in 4% Agarose solution in sterilized water for 30 min at 4°C. 50 μ m sections were then performed using a vibratome on the whole length of the sample. One out of every five sections (an average of 30 sections examined corresponding to about 600 motor neurons per animal, and about 5,000 motor neurons per experimental point) was processed for immunohistochemical analysis. Tissue sections were incubated for 1 h at room temperature in a blocking solution (10% normal donkey serum with 1% Triton X-100 and 0.5% Tween in Tris Buffer Solution (TBS)). Motor neuron immunodetection was performed using a polyclonal goat anti-choline acetyltransferase (ChAT) primary antibody (1 : 400; Chemicon, Inc., Temecula, CA) for 2 days at 4°C in 3.5% donkey serum with 0.1% Tween TBS. Sections were washed between each subsequent step with 0.1% Tween in TBS. Sections were subsequently incubated with polyclonal CyTM3-conjugated Donkey anti-Goat antibodies (1 : 400; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) for 1 h at room temperature in 3.5% donkey serum with 0.1% Tween TBS. The sections were washed three times for 10 min in TBS and mounted in VECTASHIELD[®] mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The staining specificity was checked in control incubations performed in the absence of the primary antibody.

All counts were performed using ImageJ software v1.37 (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Color images were tinted using Image Pro-Plus software, where identical brightness, contrast, and color balance adjustments were applied to all groups.

For motor end-plates labeling, whole-mount preparations of muscle fibers (about 400 NMJs per muscle and per animal, about 2000 NMJs per experimental point) were stained using Alexa Fluor[®] 568-conjugated α -bungarotoxin (4 mg.mL⁻¹ in phosphate buffered saline (PBS) with 4% Bovine Serum Albumin). Presynaptic motor nerve terminals were stained with monoclonal rabbit antibodies directed against the 145 kDa isoform of neurofilament light protein (NN18, 1 : 500; Chemicon Inc., Temecula, CA, USA) and synaptophysin (1:5; Invitrogen Life Technologies). The whole-mount preparations were subsequently incubated with an Alexa Fluor[®] 488 goat anti-rabbit IgG (1 : 400; Molecular Probes; Invitrogen Life Technologies) for 1h at room temperature.

All counts were performed using ImageJ software v1.37 (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Color images were tinted using Image Pro-Plus software, where identical brightness, contrast, and color balance adjustments were applied to all groups.

Microscopy. All immunofluorescence images were collected with a CCD camera (QImaging Retiga 2000R Fast, Cooled Mono 12 bit) mounted on Olympus microscope (BX51) using the Image Pro-Plus v6.0 software (MediaCybernetics Inc., Bethesda, MD) with x40 (4X Olympus objective UPlan FL N 0.13), 100 (10X Olympus objective UPlan FL N 0.3), 200 (20X Olympus objective FL N 0.5), 400 (40X Olympus objective UPlan FL N 0.75), 600 (60X Olympus objective UPlanS Apo 1.35 oil)

and 1000 (100X Olympus objective UPlanS Apo 1.4 oil) magnifications.

Protein and western blot analysis. The ventral part of frozen spinal cord was separated from dorsal one by razor blade at -20 ° C. A furrow still appears in the middle of the ventral part and dorsal root ganglia are visible on the dorsal part of the spinal cord. Ventral lumbar spinal cord samples (4 to 10 mg) were homogenized in 100 µl/5 mg tissues in the presence of ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris HCl pH=8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP40, 5 mM EDTA pH 8.0, 2 mM PMSF (phenyl-methylsulfonyl fluoride, Sigma-Aldrich), 50 µg/ml leupeptin, 50 µg/ml pepstatin A and 50 µg/ml aprotinin). Protein concentration of the clarified homogenates (4°C, 15 min, 13,500 rev.min⁻¹) was determined on all samples using the Bradford protein assay (Biorad Laboratories, CA). 10 µg protein samples for SMN analysis and 30 µg samples for other analysis of each homogenate were submitted to 12.5% SDS-PAGE electrophoresis (1.5 M Tris pH 8.3, 12.5% Acrylamide, 0.07% Bis, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.06% TEMED). The separated proteins were transferred on PVDF membranes (Biorad) (Towbin et al., 1984). Equal loading of samples was checked by Ponceau dye staining of the transferred gels. Western blot analysis was performed on membranes incubated overnight at 4°C in 4% BSA, 0.1% TWEEN 20, TBS pH 7.4. Each of the following primary antibodies, including monoclonal mouse anti-SMN (1 : 5,000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), polyclonal rabbit anti-Ser⁴⁷³ phospho-AKT (1 : 1000; Cell signaling Technology, Inc, Boston, MA), polyclonal rabbit anti phospho-ERK1/2 (1 : 500; Cell Signaling, Inc.), polyclonal rabbit anti-Ser¹³³ phospho-CREB (1 : 1,000; Millipore), monoclonal mouse anti-Ser¹⁸³ phospho-Elk-1 (1 : 1,000; Santa Cruz Biotechnology, Inc), monoclonal mouse anti-Tyr⁷⁰⁵ phospho-STAT3 (1 : 500; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), monoclonal rabbit anti-caspase 3 (1:1,000; Cell signaling, Inc.), monoclonal rabbit anti-IGF-1Rβ (D23H3) (1 : 1,000; Cell signaling, Inc.) was incubated overnight at 4°C in the above blocking medium. Membranes were rinsed in 0.1% TWEEN 20 in TBS for 3 x 10 min at room temperature and then incubated in horseradish peroxidase-conjugated Goat secondary antibody directed against Mouse Immunoglobulins (1 : 5,000; Biorad Laboratories, CA) and in horseradish peroxidase-conjugated Goat secondary antibody directed against Rabbit Immunoglobulins (1 : 10,000; Jackson ImmunoResearch) in 0.1% TWEEN 20 in TBS for 1h at room temperature. Bound antibody complexes were developed using the ECL system (Amersham Biotech., Saclay, France) and exposed to hyperfilm ECL-plus X ray film (Amersham Biotech.).

In some instances, membranes were stripped after immunoblotting with phospho-AKT, phospho-ERK1/2, phospho-CREB, phospho-Elk-1 and phospho-STAT3 by incubation in stripping buffer (100 mM β-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7) for 30 min at 55°C with agitation, and membranes were then blocked and re probed with polyclonal rabbit anti-AKT (1 : 1,000; Cell Signaling, Inc.), polyclonal rabbit anti-ERK1/2 (1 : 500; Cell Signaling, Inc.), polyclonal rabbit anti-CREB (1 : 1,000; Millipore), monoclonal mouse anti-Elk-1 (1 : 1,000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), polyclonal rabbit anti-STAT3 (1 : 500; Cell signalling, Inc.) and monoclonal mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antibody (GAPDH) (1 : 5,000; Chemicon). Films were quantified with ImageJ v1.37 (National Institutes of Health, Bethesda, MD) and the results reported as means ± SEM.

Chromatin immunoprecipitation. Ventral lumbar Spinal Cord samples were chopped into small pieces with a scalpel and were fixed for 15 min with 1% formaldehyde. Tissues were washed 3 times in cold PBS containing protease inhibitors (2 mM PMSF, 50 µg/ml leupeptin, 50

µg/ml pepstatin A and 50 µg/ml aprotinin) and collected by centrifugation. Cells were pelleted by centrifugation and resuspended in 300 µl of 85 mM KCl, 0.5% NP-40, 5 mM piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES) pH 8.0 in the presence of protease inhibitors (2 mM PMSF, 50 µg/ml leupeptin, 50 µg/ml pepstatin A and 50 µg/ml aprotinin). After incubation on ice for 10 min, cells were sonicated 6 times for 30 sec using Bioruptor (Diagenode, Philadelphia, PA). Lysates were cleared by centrifugation and DNA concentration was determined by nanodrop spectrophotometer. ChIP-Ademebeads (Ademtech SA, Pessac, France) were incubated for 15 min at room temperature with blocking buffer on a rotating wheel. Beads were resuspended in 125 µl of ChIP Dilution buffer (0.01% SDS, 1% Triton X100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl (pH 8.1)), and after a 1h incubation, equal amounts of DNA diluted 10 times in dilution buffer were added. DNA was incubated overnight at 4°C on a rotating wheel with 1 µg of the following antibodies: polyclonal rabbit anti-Ser¹³³ phospho-CREB (Millipore), monoclonal mouse anti-Ser¹⁸³ phospho-Elk-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc), polyclonal rabbit anti-acetyl-Histone H3 (Millipore) and polyclonal rabbit-acetyl-Histone H4 Lys8 (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY). Beads were washed sequentially in 150 mM NaCl TSE (0.1% SDS, 1% Triton X100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) with 500 mM NaCl TSE, buffer A (0.25 M LiCl, 1% NP-40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-Hcl (pH 8.1)), and 2 times with Tris-EDTA (pH 8.1) and then selectively eluted with 200 µl 1% SDS and 0.1 M NaHCO₃. Cross-links were reversed by heating at 65°C for 4 h after adding NaCl at a 200 mM final concentration. After treatment with proteinase K (50µg/ml) for 1 h at 37°C, DNA was purified using GeneClean Turbo Kit (Q-Biogene, MP Biomedicals, Illkirch, France). Real time PCR analysis of inputs or immunoprecipitated DNAs was performed.

Quantitative real time PCR analysis. Ventral lumbar Spinal Cord samples were chopped into small pieces with a scalpel and RNA was extracted using TRIzol® (Invitrogen). Each RNA preparation was treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega). One microgram was reverse transcribed with random primers (Promega) and reverse transcriptase M-MLV-RT (Invitrogen).

Quantitative real time PCR was performed with standard protocols using SYBR®Green ROX Mix (ABgene, Courtaboeuf, France) as a fluorescent detection dye in ABI PRISM® 7000 in a final volume of 10 µl which also contains 300 nM of the following primers (Operon, Cologne, Germany) : SMN2 Exon 4-Exon 5 segment F : 5'-TGTGTTGTGGTTTACTACTGG-3'; SMN2 Exon 5 segment R : 5'-TATTTCACAGGAGACCTGGAG-3'; SMN2 Exon 7-Exon 8 segment F : 5'-AAAAAGGAAGGAGGTGCTCAC-3'; SMN2 Exon 7-Exon 8 segment R : 5'-GCCTCACCACCGTGCTGG-3'; IGF-1R alpha F : 5'-GTGGGGGCTCGTGTTCCTC-3'; IGF-1R alpha R : 5'-GATCACCGTGACAGTTTCCA-3'; IGF-1R beta F : 5'-GCATCTGATCATTGCTCTG-3'; IGF-1R beta R : 5'-GCCCAACCTGCTGTTATTTC-3'; SOCS-1 F : 5'-GACACTCACTCCGCACCTT-3'; SOCS-1 R : 5'-AAGAAGCAGTTCCGTTGGC-3'; SOCS-3 F : 5'-CTCGCTTCGGGACTAGC-3'; SOCS-3 R : 5'-CTGGTACTCGCTTTTGG-3'; 18S F : 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3'; 18S R : 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'; SMN2 promoter site 1 [-2667nu to -2401nu] F : 5'-GAGAGAGTTCCAGGAGTCAA-3'; SMN2 promoter site 1 [-2667nu to -2401nu] R : 5'-GTCTCAAACCTCGGTGCTT-3'; SMN2 promoter site 2 [+160nu to +503nu] F : 5'-TCGTAGAAAGCGTGAGAAGT-3'; SMN2 promoter site 2 [+160nu to +503nu] R : 5'-AAAACGCGGACCACAACTC-3'. The relative amounts of DNA in samples were determined on the basis of the threshold cycle for each PCR product (Ct).

Statistical analysis. All values are displayed as means and standard error of the mean (SEM) within each group (Systat v 8.0, SPSS Inc., Chicago, IL). Statistical analysis was performed and comparison between groups were done using ANOVA and post-hoc test LSD. Survival analysis was performed using Kaplan-Meier analysis.

RESULTS

The IGF-1R over-expression in the spinal cord of SMA-like mice is reduced by a neuroprotective exercise paradigm.

We first analyzed the distribution of IGF-1R transcripts using *situ* hybridization in the spinal cord of sedentary and running-based trained SMA-like and control mice at P12 (Figure 1A-D). We found that IGF-1 receptors were significantly over-expressed in the spinal cord of sedentary SMA-like mice, throughout the cord, including the motor column cells. We found that a known neuroprotective exercise paradigm (Grondard et al., 2005) significantly reduced IGF-1R expression in SMA spinal cord. We next analyzed the IGF-1R α - and β -subunit level of expression by qRT-PCR (Figure 1E). This analysis further confirmed that the IGF-1R over-expression in SMA spinal cord was reduced by physical exercise.

We then questioned whether the activation profile of the three signaling pathways that lay downstream IGF-1R i.e. ERK, AKT and JAK/STAT3 signaling pathways, could be altered in SMA spinal cord. To this aim, we analyzed the phosphorylation status of the ERK and AKT kinases in the spinal cord of trained and untrained SMA-like mice and controls. For the JAK/STAT pathway, we analyzed both the phosphorylation status of the STAT3 transcription factor and, by qRT-PCR, the expression level of the Suppressor-of-Cytokine-Signaling 1 and 3 (SOCS-1 and SOCS-3) genes, known as direct targets of STAT3 in the CNS (Yadav et al., 2005). We found that the state of ERK phosphorylation was consistently higher and those of AKT consistently lower in the spinal cord of untrained SMA-like mice, compared to controls (Figure 1F-I), as reported in our previous studies (Biondi et al., 2010). The activation profile of STAT3 (Figure 1J-K) and the expression level of SOCS-1 and SOCS-3 (Figure 1L-M) were significantly increased in SMA spinal cord compared to controls, suggesting that all the three signaling pathways including the JAK/STAT pathway were altered in SMA spinal cord. Expectedly, the exercise paradigm increased AKT phosphorylation by more than 2-fold and decreased ERK phosphorylation by 2-fold in the spinal cord of SMA-like mice (Figure 1F-I). Similarly, the activation of STAT3 and the expression level of the SOCS were decreased by exercise in SMA spinal cord and reached a level comparable to controls (Figure J-M). Accordingly, the p-AKT/total AKT ratio increased and the p-ERK/total ERK, p-STAT3/total STAT3 decreased following exercise, reflecting an increase in the activity level of the AKT signaling pathway and conversely a decrease in the activity level of the ERK and JAK/STAT signaling pathways.

Genetically reduced IGF-1R expression shifts the equilibrium between ERK/JAK and AKT signaling pathways in SMA spinal cord.

To test whether the IGF-1R expression level is involved in the control of the ERK, AKT, JAK/STAT signaling pathway equilibrium in SMA spinal cord, we create a SMA-like mouse model in which the *IGF-1R* gene is heterozygously invalidated (*Smr* ^{$\Delta 7/\Delta 7$} , *SMN2*^{+/+}, *IGF-1R*^{+/-}) first by crossing breeder mice for severe SMA-like mice (*Smr* ^{$\Delta 7/\Delta 7$}) (Hsieh-Li et al., 2000) with *IGF-1R*^{+/-} mice (Holzenberger et al., 2003), and then by backcrossing breeder mice for severe SMA-like mice harboring the *IGF-1R* deletion (*Smr* ^{$\Delta 7/\Delta 7$} , *IGF-1R*^{+/-}) with breeder mice for severe SMA-like mice carrying the two *IGF-1R* alleles

(*Smr* ^{$\Delta 7/\Delta 7$} , *SMN2*^{+/+}, *IGF-1R*^{+/-}) (Figure 2A). These crossings were performed for at least 10 generation in order to purify the genetic background of the mice. Among the different genotypes generated in offspring, the original parent genotypes (*Smr* ^{$\Delta 7/\Delta 7$} , *SMN2*^{+/+}, *IGF-1R*^{+/-}) mice and (*Smr* ^{$\Delta 7/\Delta 7$} , *SMN2*^{+/+}, *IGF-1R*^{-/-}) mice were designated as controls and *IGF-1R*^{+/-} controls, respectively and the SMA-like mice, (*Smr* ^{$\Delta 7/\Delta 7$} , *SMN2*^{+/+}, *IGF-1R*^{+/-}) mice and (*Smr* ^{$\Delta 7/\Delta 7$} , *SMN2*^{+/+}, *IGF-1R*^{-/-}) mice were designated as SMA and *IGF-1R*^{-/-} SMA, respectively. Expectedly, the partial deletion of the *IGF-1R* gene significantly reduced the expression levels of IGF-1R α - and β -subunit as revealed by qRT-PCR in the spinal cord of SMA-like and control mice (Figure 2B). In this new strain, SMA mice lived no longer than 13 days as reported for the former severe SMA-like mouse strains (Hsieh-Li et al., 2000), indicating that the genetic background had been stabilized.

In order to further investigate the potential role of IGF-1R expression level in the activation control of the specific intracellular pathways, we analyzed the phosphorylation status of ERK, STAT3 and AKT and the expression level of SOCS-1 and 3 in the spinal cord of SMA, *IGF-1R*^{+/-} SMA, control and *IGF-1R*^{-/-} control mice at P12 (Figure 2B-J). First, we confirmed that, in the spinal cord of SMA-like mice, ERK and STAT3 phosphorylation were found consistently higher and those of AKT consistently lower compared to controls. In addition, the expression levels of SOCS-1 and 3 were found higher in SMA than in control spinal cords. We then investigated the effects of a reduced expression of IGF-1R on these signaling pathways in SMA and control spinal cord. We found that reducing the expression level of IGF-1R in the spinal cord of SMA mice resulted in an increase of AKT phosphorylation by more than 2-fold and in a 25% and a 2-fold decrease of ERK and STAT3 phosphorylation, respectively (Figure 2B-J). The expression levels of SOCS-1 and 3 were significantly reduced by IGF-1R depletion in SMA and in control spinal cords (Figure 2I-J). Accordingly, the p-AKT/total AKT ratio increased and the p-ERK/total ERK, p-STAT3/total STAT3 ratios decreased in the spinal cord of *IGF-1R*^{+/-} SMA mice, reflecting an increase in the activity level of AKT and conversely a decrease in the activity level of ERK and JAK pathways. All these data suggested that reducing the expression level of IGF-1R is sufficient to induce a shift in the dynamic equilibrium between ERK/JAK and AKT signaling pathways in SMA spinal cord.

Overexpression of IGF-1R reverses the shift in the dynamic equilibrium between ERK and AKT signaling pathways in MN-1 neuronal cells.

To further confirm that the expression level of IGF-1R could affect the activation pattern of ERK and AKT signaling pathways in neurons, we tested *in vitro* the effects of the over-expression of IGF-1R on the activation profile of ERK and AKT. MN-1 cells were transfected by a plasmid containing the rat IGF-1R coding sequence (Pietrzowski et al., 1992) and analyzed for ERK and AKT activation patterns. We found that, upon IGF-1 stimulation, the increased expression level of IGF-1R in MN-1 cells (Figure 3A-B) resulted in a significant increase of ERK phosphorylation and in a decrease of AKT phosphorylation (Figure 3C-F). Accordingly, the p-ERK/total ERK ratio increased and the p-AKT/total AKT ratio decreased in IGF-1R overexpressing MN-1. As expected, no change in ERK and AKT activation pattern were found in IGF-1 deprived cultures confirming that the observed effects were IGF-1R dependent. Interestingly, in undifferentiated MN-1 cells, IGF-1R overexpression had no effect on the ERK/AKT equilibrium, suggesting that the control exerted by the cell-surface receptor concentration for the triggering of intracellular signaling pathways was dependent of the neuronal differentiation level.

We next tested the potential relationship between SMN depletion and IGF-1R expression level in neurons. To address this question, we analyzed the IGF-1R β -subunits expression in MN-1 cells overexpressing a siRNA specifically directed against the SMN transcripts. We found that the SMN depletion in MN-1 cells led to a significant increase of IGF-1R β -subunit protein (Figure 3G-H). These results suggested that the SMN depletion might be responsible of IGF-1R over-expression in neurons.

Reduced IGF-1 signaling enhances SMN protein expression in the spinal cord of SMA-like mice.

We next questioned whether the IGF-1R reduction and concomitant shift from ERK to AKT could influence SMN expression. Indeed, ERK and AKT are supposedly activated by phosphorylation of the transcription factors Elk-1 and CREB, respectively, whose binding level on the *SMN2* gene promoter of both sites could direct SMN expression in SMA spinal cord (Branchu et al., 2012). In SMA background, activated Elk-1 was shown to display a repressive role on *SMN2* gene transcription contrasting with the activating role of CREB (Branchu et al., 2012). As expected, we found that the activation level of Elk-1 and CREB paralleled those of their respective activating kinase in SMA, *IGF-1R^{+/+}* SMA, control and *IGF-1R^{-/-}* control spinal cord (Figure 4A-D). Furthermore, the level of Elk-1 binding on the *SMN2* promoter, originally found higher in SMA compared to controls, was significantly lowered by IGF-1R reduction, as revealed by ChIP experiments (Figure 4E-F). In contrast, the level of CREB binding on the *SMN2* promoter, originally found lower in SMA compared to controls, was significantly increased by IGF-1R reduction (Figure 4G-H). Expectedly, the CREB binding on *SMN2* promoter was correlated with a significant increase in histone H3 and H4 acetylation (Figure 4I-L) suggesting a chromatin remodeling induced by a reduction in IGF-1R at the *SMN2* promoter level.

We then analyzed the impact of IGF-1R reduction on the SMN expression profile in the spinal cord of SMA, *IGF-1R^{+/+}* SMA, control and *IGF-1R^{-/-}* control mice at P12. The increase in SMN protein concentration induced by IGF-1R reduction is clearly evidenced by the immunoblot analysis performed at the lumbar spinal cord level (Figure 4M-N). A 2-fold increase in SMN expression level was observed in *IGF-1R^{-/-}* SMA mice compared to SMA-like mice was albeit 50 % lower compared to controls.

We next asked whether the increased SMN protein level resulted from an activation of *SMN2* gene expression and/or from a modulation of the exon-7 inclusion in the SMN transcripts. We quantified the fraction of exon-7-containing mRNA inside the population of SMN transcripts using qRT-PCR aimed at amplifying either the exon7-exon8 segment (E7-E8) or the exon 4-exon 5 segment (E4-E5) in the ventral spinal cord of SMA, *IGF-1R^{+/+}* SMA, controls and controls-1R mice at P12 (Figure 4O-P). We found that the reduction of IGF-1R did increase both the steady-state level of SMN transcripts and also the relative level of exon-7 containing SMN transcripts.

Reduced IGF-1 signaling protects motor neurons in type 2 SMA-like mice.

Since the IGF-1R reduction induced a significant increase of SMN expression in SMA spinal cord, we questioned whether this effect could be beneficial in protecting motor neurons from cell death. Thus, we compared the number of ChAT-positive motor-neurons in the ventral spinal cord of SMA, *IGF-1R^{+/+}* SMA, control and *IGF-1R^{-/-}* control mice at P12 (Figure 5A-D). As found in the former SMA mouse strain (Hsieh-Li et al., 2000; Grondard et al., 2005), a 34% loss of motor neurons was observed in the lumbar (L1-L5) ventral spinal cord of SMA-like mice in comparison to control mice (Figure 5E). *IGF-1R^{-/-}* SMA mice only showed a 10% reduction in the

number of motor neurons, unexpectedly demonstrating that reducing IGF-1 pathway significantly limited the extent of motor-neuron death in SMA. Furthermore, the motor-neuron cell-body-area evaluation provided evidence of a persistent motor neurons atrophy in the ventral horn of the spinal cord of the SMA-like mice compared to control mice at P12 (Figure 5F). In contrast, the extent of atrophy was significantly limited in *IGF-1R^{-/-}* SMA mice. No difference could be observed in the number of motor neurons in control and *IGF-1R^{-/-}* control mice at the same age.

To determine whether the reduction of IGF-1R interfered with the apoptotic process in the spinal cord of SMA-like mice, we evaluated the activation of the caspase-3 in the ventral spinal cord of SMA and *IGF-1R^{-/-}* SMA mice (Figure 5G-H). As shown in these figures, the IGF-1R reduction limited the range of the apoptotic process in SMA mouse spinal cord.

Genetically reduced IGF-1 signaling improves the motor behavior and remarkably prolongs survival of type 2 SMA-like mice.

We then questioned whether the neuroprotection induced by the reduction of IGF-1R expression would improve the motor behavior of the SMA mice. We first subjected the mice to a grip test. We found that, in contrast to SMA-like mice that were unable to efficiently grip the metal rod, the grip time of *IGF-1R^{-/-}* SMA progressively increased to about 17 ± 3 sec at P19 and then stabilized until death (Figure 6a). However, these performances remained lower compared to the control mice. We then compared the spontaneous activity of the mice in an open field (Figure 6A-C). Again, while SMA-like mice displayed a strongly reduced exploratory activity compared to age-matched controls, the *IGF-1R^{-/-}* SMA mice displayed a progressive increase in exploratory behavior until P20, which decreased thereafter until death (Figure 6D-F).

The impact of the IGF-1R reduction on the life span of SMA mice was then evaluated. Reducing IGF-1R expression significantly increased survival of severe SMA-like mice (Figure 6G-I). The mean survival increased from 10.90 ± 2.22 days for SMA-like mice to 21.53 ± 5.25 days for the *IGF-1R^{-/-}* SMA, irrespective of the gender of the mice and which representing a 2-fold increase in lifespan. Furthermore and as expected, the SMA-like mice typically displayed a severe body weight reduction (Figure 6J-K). However, the IGF-1R reduction led to a significant and progressive increase in the body weight of SMA-like mice, until death.

Reduced IGF-1 signaling improves the neuromuscular junction phenotype in SMA mice.

Since alteration of the neuromuscular junction development is today considered as a hallmark of SMA pathogenesis in patients (Kariya et al., 2008) and mouse models (Biondi et al., 2008; Kariya et al., 2008; Kong et al., 2009), we asked whether the induced benefits following IGF-1R reduction in SMA mouse lifespan could correlate with significant improvements in the neuromuscular junction (NMJ) phenotype. We analyzed the shape and the surface of the NMJs in SMA, *IGF-1R^{+/+}* SMA, control and *IGF-1R^{-/-}* control at P12 (Figure 7A-D). The developmental changes in the synapse shape (i.e. from an immature uniform plaque of Acetyl-Choline receptors (AChR) to a perforated large plaque of AChR that eventually adopts a pretzel form), were determined for innervated NMJs using α -bungarotoxin staining of the two extensor muscles, namely, the slow-twitch *soleus* and fast-twitch *plantaris*, and the flexor fast-twitch *tibialis*. We found that up to 63% of the NMJ were elliptical, made of uniform plaques of AChR in the two extensors muscles of SMA-like mice at P12. As expected for a flexor muscle at this age (Biondi et al., 2008), NMJs in the *tibialis* were more advanced in maturation, with only 34% of immature NMJs in SMA-like

mice. In contrast, only 32% and 11% of immature NMJs were found respectively in extensor and flexor muscles of controls. The IGF-1R reduction improved the NMJ morphology in the three muscles in SMA mice, as demonstrated by the increase in NMJ perforation (Figure 7E, G, I) and enlargement (Figure 7F, H, J) of the NMJ on the muscle fibers. These effects of the IGF-1R reduction on the NMJ maturation were only evidenced in SMA-like mice.

Reduced IGF-1 signaling improves the muscle phenotype in SMA mice.

We finally examined whether the IGF-1R reduction could alleviate muscular symptoms in SMA, *IGF-1R^{+/Δ7}* SMA, control and *IGF-1R^{+/+}* control mice at P12. Since a decrease of AKT activation has been reported in atrophic muscles of severe ALS patients (Yin et al., 2012), we wondered if the beneficial effects induced by the reduction of IGF-1R signaling in SMA-like mice muscles could correlated with an increase of AKT activation level. We then analyzed the phosphorylation status of ERK and AKT in the *tibialis* of SMA, *IGF-1R^{+/Δ7}* SMA, control and *IGF-1R^{+/+}* control mice at P12 (Figure 8A-D). We first confirmed that, in the muscles of SMA-like mice, the level of ERK phosphorylation was consistently higher and those of AKT were consistently lower compared to controls. IGF-1R reduction resulted in a 2-fold increase in AKT phosphorylation and a 25% decrease in ERK phosphorylation (Figure 8A-D). Accordingly, the p-AKT/total AKT ratio increased and the p-ERK/total ERK ratio decreased in the muscles of *IGF-1R^{+/Δ7}* SMA mice, reflecting an increase in the activity level of AKT and conversely a decrease in the activity level of ERK pathway, as found in the spinal cord. As expected, the activation level of the transcription factors Elk-1 and CREB paralleled those of their respective activating kinase, i.e. ERK and AKT, respectively in SMA, *IGF-1R^{+/Δ7}* SMA, control and *IGF-1R^{+/+}* control muscles (Figure 8E-H). All these intracellular pathways modifications resulted in a significant SMN expression increase in SMA muscles at the protein (Figure 8I-J) and transcript (Figure 8K-L) levels. Interestingly, as found in the spinal cord, the IGF-1R reduction led to both an increase of SMN transcripts steady state level and an increase of the proportion of exon-7 containing transcripts.

DISCUSSION

By comparing behavioral, cellular and molecular aspects of SMA in the (*Smn^{Δ7/Δ7}*, *SMN2^{+/+}*) and (*Smn^{Δ7/Δ7}*, *SMN2^{+/Δ7}*; *IGF-1R^{+/+}*) mice, we found that reduced IGF-1 signaling protects mice from motor neuron degeneration leading to a significant increase in lifespan. These benefits are linked to an increase in SMN expression in the spinal cord and myofibers of *IGF-1R^{+/Δ7}* SMA mice, likely as a result of the reactivation of the AKT/CREB pathway. All together, the present data provided either by the analysis of the effects of physical exercise on IGF-1R expression or by the analysis of direct IGF1R down- or overexpression, indicate that, in nervous cells and myofibers, altering IGF-1R expression levels could alter the balance between the different signaling pathways that lay downstream the receptor.

At least based on *in vitro* evidence and the existence of IGF-I receptors, it is well known that all types of cells in the central nervous system are targeted by IGF-I, including motor neurons (Kaspar et al., 2003; Rabinovsky et al., 2003; Dobrowolny et al., 2005; Ozdinler and Macklis, 2006). While for many years canonical signaling through the IGF-I receptors was considered to include the PI3K/AKT, Ras/ERK and more recently the JAK/STAT pathways (Himpe and Kooijman, 2009), the signaling network elicited by IGF-I is likely to be activated in a cell-context fashion, making it difficult to predict the pathway that will be ultimately triggered and, consequently, which biological effect will occurred. The present data

suggest that there are some cell-specific circumstances in which intracellular signaling routes triggered downstream IGF-1R might depend on the expression level of the receptor at the cell surface. Reducing IGF-1R expression led to a shift from both ERK and JAK to AKT pathway and to a parallel alteration of their signaling cascade until the transcription factors, Elk-1, STAT and CREB, respectively. This shift occurred only in SMA tissues in which IGF-1R is over-expressed by more than 3-fold compared to controls and not in wild-type muscle and spinal cells. This discrepancy might be attributed to the different range in the variation of IGF-1R expression obtained by its partial inactivation. The partial invalidation of IGF-1R indeed led to a drastic 3-fold decrease in IGF-1R expression in SMA spinal cord, while reducing it by half in controls, as evidenced by qRT-PCR experiments. These data suggest a need for a highly-perturbed receptor expression to unbalance signal transduction. Accordingly, in the IGF-1R-overexpressing MN-1 cells, a shift from AKT to ERK could be obtained although these cells displayed a normal background, further suggesting that the alteration in intracellular pathway triggering is not solely restricted to SMA tissue and is likely to be a consequence of a high variation in IGF-1R expression. Unexpectedly, the partial reduction of IGF-1R in controls did not result in half of the activation rate of ERK and AKT as previously reported in fibroblasts (Holzenberger et al., 2003), suggesting a cell-specific adaptation to IGF-1R modulation of expression. The precise mechanism involving the IGF-1R expression-dependent shift between ERK/JAK and AKT pathway remains an open question. It is likely that the molecular origin of the shift relied to the binding rate of the first intermediary of the signaling cascade, i.e. IRS1/2 for the triggering of AKT and p66SHC for the triggering of ERK (Butler et al., 1998). IRS seems to display a high affinity for the phosphorylated receptor (Huang et al., 2001) and, the time course of SHC phosphorylation following IGF-1R stimulation was slower compared to IRS-1 (Sasaoka et al., 1996), leading us to speculate that IRS could bind to the receptor even at a low rate of receptor expression. When bound to IGF-1R, IRS1/2 is expected to activate AKT through PI3K, which in turn could activate CREB (Tseng et al., 2002). The affinity of SHC for the phosphorylated IGF-1R receptor remains to be elucidated but in the case of a lesser affinity of IRS to IGF-1R, its binding would require a high receptor expression at the cell surface. In such a scenario, IGF-1R-bound SHC would activate ERK through the classic RAF/RAS cascade, and is likely to inhibit AKT as recently shown in muscle and spinal cord (Branchu 2012).

Whatever the molecular mechanism involved in the signal transduction switch, IGF-1 signaling reduction favored the activation of the AKT/CREB pathway and the inhibition of the ERK/Elk-1 pathway. The CREB activation, induced by IGF-1R reduction, expectedly led to its increased binding to the *SMN2* promoter and, conversely, the Elk-1 inhibition to its binding decrease. This shift in transcription factor binding is followed by increased acetylation of H3 and H4 histones in crucial sites for the activation of *SMN2* transcription (Majumder et al., 2004; Branchu et al., 2012). These molecular events on *SMN2* promoter correlated with both an increase of SMN steady state level and an increase of exon-7 inclusion in SMN transcripts. This dual effect on *SMN2* gene expression i.e. transcriptional and post-transcriptional is unexpected in this mouse model at this age in the light of the effects of NMDA receptor activation in (*Smn^{Δ7/Δ7}*, *SMN2^{+/+}*) mice at P12. Indeed, the NMDA-induced activation of the AKT/CREB pathway led only to the promotion of exon-7 inclusion in SMN transcripts without changes at the transcriptional level of *SMN2* genes (Biondi et al., 2010). An effect on the *SMN2* gene transcription upon CREB phosphorylation induced either by NMDA receptor activation (Biondi et al., 2010) or ERK inhibition (Branchu

et al., 2012) was, to date, only found during the first week (post-natal day 6) in another severe mouse model of SMA. The fact that the IGF-1R reduction recapitulated both the CREB-induced transcriptional effects though to occur during the first week of life in SMA-like mice and the post-transcriptional effects occurring during the second week, suggests a constitutive adaptation of the molecular background, and notably the proteins involved in the control of *SMN2* expression. Identifying these molecules may open new perspectives in modulating *SMN2* gene expression both through transcriptional and post-transcriptional mechanisms.

Furthermore, while all ERK/Elk-1, JAK/STAT and AKT/CREB pathways have already been linked to neuroprotection (Vemuri and McMorris, 1996; D'Mello et al., 1997; Parrizas et al., 1997; Crowder and Freeman, 1998; Meyer-Franke et al., 1998; Yadav et al., 2005), it is today largely admitted that the IGF-I-mediated neuroprotection occurs through the activation of the AKT/CREB pathway as demonstrated for many nervous cell systems (Cardone et al., 1998; Kermer et al., 2000; Brywe et al., 2005; Soeda et al., 2010; Dastidar et al., 2012). As a matter of fact, in cerebellar granule neurons, the IGF-1 induced neuroprotection resulted from both the activation of AKT and inhibition of MEK-ERK1/2 by AKT pathway (Subramaniam et al., 2005). Consequently, the neuroprotection induced by IGF-1R reduction in SMA spinal cord, as evidenced by the relative persistence of the motor neuron population and the limited activation of caspase-3, may result from both the increase in SMN protein expression and the activation of the two powerful antiapoptotic molecules AKT and CREB. Although no role has been reported to date for the JAK/STAT pathway in SMA pathogenesis, the fact that it proved to parallel the activation profile of ERK, and then contrasts those of AKT, favor the hypothesis of a non-beneficial role for SMA.

Therefore, the present study revealed an unexpected link between the regulation of IGF-1R expression and SMN expression level. The *in vitro* inhibition of SMN expression in neuronal cells is indeed sufficient to induce a significant IGF-1R expression, irrespectively of the rate of its circulating ligand. This result is in agreement with the results found in human muscles in which the range of IGF-1R overexpression inversely correlates with the level of SMN expression (Millino et al., 2009). Indeed, muscles of type 1 SMA patients, though to be severely depleted of SMN, displayed a dramatic IGF-1R overexpression while muscles from type 3 SMA patients displayed only a weak IGF-1R overexpression. This result may account also for the alteration of IGF-1R expression pattern in ALS, characterized by both a disruption of the SMN complex (Kariya et al., 2012), Gems number (Yamazaki et al., 2012) and an IGF-1R overexpression (Narai et al., 2005; Lunetta et al., 2012). Furthermore, it could be speculated at the light of the present results that the constitutive down activation of AKT recently found in the muscles of ALS patients (Yin et al., 2012), might result from muscular IGF-1R overexpression. The fact that the expression of IGF-1R was found dramatically increased in the two genetic motor-neuron diseases is puzzling and the impact of this overexpression on motor unit disruption remains to be investigated. Over the past 20 years, the literature consistently indicated that IGF-1 was one of the most powerful anti-apoptotic agents for neurons conducting groups to test the potential effects of IGF-1 in alleviating symptoms of a number of neurodegenerative diseases including those specifically affecting motor neurons such as ALS (Sakowski et al., 2009) and SMA (Bosch-Marce et al., 2011; Murdocca et al., 2012; Tsai et al., 2012). Tested in different mouse models of SMA, treatments with IGF-1 (Bosch-Marce et al., 2011; Tsai et al., 2012) or IGF-1/IGF-BP3 complex (Murdocca et al., 2012) gave rise to disappointing results in terms of SMA mouse survival. Moreover, clinical trials using IGF-1

treatment failed in reducing ALS symptoms in humans (Sorenson et al., 2008; Howe et al., 2009). These unexpected lacks of IGF-1 effects might be due to the misexpression of IGF-1R in diseased tissues, notably its overexpression potentially leading to the activation of the unlikely pathway for triggering at best the IGF-1 beneficial effects.

The present data unexpectedly suggest that reducing and not increasing IGF-1 pathway is neuroprotective for motor neurons in SMA-like mice. These results are in line with a previous study reporting the benefits of reducing IGF-1 pathway for neuroprotection in a mouse model of Alzheimer disease (Cohen et al., 2009). This new aspect of the IGF-1 pathway biology should be considered when designing IGF-1 based treatments for neurodegenerative diseases.

REFERENCES

- Biondi O, Grondard C, Lecolle S, Deforges S, Pariset C, Lopes P, Cifuentes-Diaz C, Li H, della Gaspera B, Chanoine C, Charbonnier F (2008) Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* 28:953-962.
- Biondi O, Branchu J, Sanchez G, Lancelin C, Deforges S, Lopes P, Pariset C, Lecolle S, Cote J, Chanoine C, Charbonnier F (2010) In vivo NMDA receptor activation accelerates motor unit maturation, protects spinal motor neurons, and enhances SMN2 gene expression in severe spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 30:11288-11299.
- Bosch-Marce M, Wee CD, Martinez TL, Lipkes CE, Choe DW, Kong L, Van Meerbeke JP, Musaro A, Sumner CJ (2011) Increased IGF-1 in muscle modulates the phenotype of severe SMA mice. *Hum Mol Genet* 20:1844-1853.
- Branchu J, Biondi O, Chali F, Collin T, Leroy F, Mamchaoui K, Makoukji J, Pariset C, Lopes P, Massaad C, Chanoine C, Charbonnier F (2012) Shift from ERK to AKT/CREB pathway increases SMN expression in Spinal-Muscular Atrophy-like mice and patient cells. *J Neurosci* (In press).
- Brywe KG, Mallard C, Gustavsson M, Hedtjarn M, Leverin AL, Wang X, Blomgren K, Lsgaard J, Hagberg H (2005) IGF-I neuroprotection in the immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of Akt and GSK3beta? *Eur J Neurosci* 21:1489-1502.
- Butler AA, Yakar S, Gewolb IH, Karas M, Okubo Y, LeRoith D (1998) Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 121:19-26.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-1321.
- Carro E, Nunez A, Busiguina S, Torres-Aleman I (2000) Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci* 20:2926-2933.
- Carro E, Trejo JL, Busiguina S, Torres-Aleman I (2001) Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci* 21:5678-5684.
- Cohen E, Paulsson JF, Blinder P, Burstyn-Cohen T, Du D, Estepa G, Adame A, Pham HM, Holzenberger M, Kelly JW, Masliah E, Dillin A (2009) Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. *Cell* 139:1157-1169.
- Corbo M, Lunetta C, Magni P, Dozio E, Ruscica M, Adobati L, Silani V (2010) Free insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding proteins-2 and -3 in serum and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Eur J Neurol* 17:398-404.
- Crawford TO, Pardo CA (1996) The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* 3:97-110.
- Crowder RJ, Freeman RS (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J Neurosci* 18:2933-2943.
- D'Mello SR, Borodetz K, Soltoff SP (1997) Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. *J Neurosci* 17:1548-1560.
- Dastidar SG, Narayanan S, Stifani S, D'Mello SR (2012) Transducin-like enhancer of Split-1 (TLE1) combines with Forkhead box protein G1 (FoxG1) to promote neuronal survival. *J Biol Chem* 287:14749-14759.
- Dobrowolny G, Giacinti C, Pelosi L, Nicoletti C, Winn N, Barberi L, Molinaro M, Rosenthal N, Musaro A (2005) Muscle expression of a local IGF-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. *J Cell Biol* 168:193-199.
- Fukaya M, Hayashi Y, Watanabe M (2005) NR2 to NR3B subunit switchover of NMDA receptors in early postnatal motoneurons. *Eur J Neurosci* 21:1432-1436.
- Grondard C, Biondi O, Armand AS, Lecolle S, Della Gaspera B, Pariset C, Li H, Gallien CL, Vidal PP, Chanoine C, Charbonnier F (2005) Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* 25:7615-7622.
- Gualco E, Wang JY, Del Valle L, Urbanska K, Peruzzi F, Khalili K, Amini S, Reiss K (2009) IGF-IR in neuroprotection and brain tumors. *Front Biosci* 14:352-375.
- Himpe E, Kooijman R (2009) Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT) pathway. *Biofactors* 35:76-81.
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloan A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421:182-187.
- Howe CL, Bergstrom RA, Horzodovsky BF (2009) Subcutaneous IGF-1 is not beneficial in 2-year ALS trial. *Neurology* 73:1247; author reply 1247-1248.

- Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, Li H (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 24:66-70.
- Hua Y, Sahashi K, Rigo F, Hung G, Horev G, Bennett CF, Krainer AR (2011) Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* 478:123-126.
- Huang M, Lai WP, Wong MS, Yang M (2001) Effect of receptor phosphorylation on the binding between IRS-1 and IGF-1R as revealed by surface plasmon resonance biosensor. *FEBS Lett* 505:31-36.
- Hubers L, Valderrama-Carvajal H, Laframboise J, Timbers J, Sanchez G, Cote J (2011) HuD interacts with survival motor neuron protein and can rescue spinal muscular atrophy-like neuronal defects. *Hum Mol Genet* 20:553-579.
- Kariya S, Re DB, Jacquier A, Nelson K, Przedborski S, Monani UR (2012) Mutant superoxide dismutase 1 (SOD1), a cause of amyotrophic lateral sclerosis, disrupts the recruitment of SMN, the spinal muscular atrophy protein to nuclear Cajal bodies. *Hum Mol Genet* 21:3421-3434.
- Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, Leykekhman O, Lutz C, Arkovitz MS, Landmesser LT, Monani UR (2008) Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 17:2552-2569.
- Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH (2003) Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 301:839-842.
- Kermer P, Klocker N, Labes M, Bahr M (2000) Insulin-like growth factor-I protects axotomized rat retinal ganglion cells from secondary death via PI3-K-dependent Akt phosphorylation and inhibition of caspase-3 *In vivo*. *J Neurosci* 20:2-8.
- Kolb SJ, Battle DJ, Dreyfuss G (2007) Molecular functions of the SMN complex. *J Child Neurol* 22:990-994.
- Kong L, Wang X, Choe DW, Polley M, Burnett BG, Bosch-Marce M, Griffin JW, Rich MM, Sumner CJ (2009) Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 29:842-851.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80:155-165.
- Lorson CL, Androphy EJ (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet* 9:259-265.
- Lunetta C, Serafini M, Prella A, Magni P, Dozio E, Ruscica M, Sassone J, Colciago C, Moggio M, Corbo M, Silani V (2012) Impaired expression of insulin-like growth factor-1 system in skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Muscle Nerve* 45:200-208.
- Majumder S, Varadharaj S, Ghoshal K, Monani U, Burghes AH, Jacob ST (2004) Identification of a novel cyclic AMP-response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene. *J Biol Chem* 279:14803-14811.
- Meyer-Franke A, Wilkinson GA, Kruttgen A, Hu M, Munro E, Hanson MG, Jr., Reichardt LF, Barres BA (1998) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* 21:681-693.
- Millino C, Fanin M, Vettori A, Laveder P, Mostacciolo ML, Angelini C, Lanfranchi G (2009) Different atrophy-hypertrophy transcription pathways in muscles affected by severe and mild spinal muscular atrophy. *BMC Med* 7:14.
- Murdocca M, Malgieri A, Luchetti A, Saieva L, Dobrowolny G, De Leonibus E, Filareto A, Quitadamo MC, Novelli G, Musaro A, Sangiulio F (2012) IPLEX Administration Improves Motor Neuron Survival and Ameliorates Motor Functions in a Severe Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *Mol Med* 18:1076-1085.
- Narai H, Nagano I, Ilieva H, Shiote M, Nagata T, Hayashi T, Shoji M, Abe K (2005) Prevention of spinal motor neuron death by insulin-like growth factor-1 associating with the signal transduction systems in SODG93A transgenic mice. *J Neurosci Res* 82:452-457.
- Oshima S, Fukaya M, Masabumi N, Shirakawa T, Oguchi H, Watanabe M (2002) Early onset of NMDA receptor GluR epsilon 1 (NR2A) expression and its abundant postsynaptic localization in developing motoneurons of the mouse hypoglossal nucleus. *Neurosci Res* 43:239-250.
- Ozdinler PH, Macklis JD (2006) IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nat Neurosci* 9:1371-1381.
- Parrizas M, Saltiel AR, LeRoith D (1997) Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 272:154-161.
- Pietrzkowski Z, Sell C, Lammers R, Ullrich A, Baserga R (1992) Roles of insulinlike growth factor 1 (IGF-1) and the IGF-1 receptor in epidermal growth factor-stimulated growth of 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 12:3883-3889.
- Rabinovsky ED, Gelir E, Gelir S, Lui H, Kattash M, DeMayo FJ, Shenaq SM, Schwartz RJ (2003) Targeted expression of IGF-1 transgene to skeletal muscle accelerates muscle and motor neuron regeneration. *FASEB J* 17:53-55.
- Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M (2003) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 163:801-812.
- Sakowski SA, Schuyler AD, Feldman EL (2009) Insulin-like growth factor-I for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 10:63-73.
- Salazar-Gruoso EF, Kim S, Kim H (1991) Embryonic mouse spinal cord motor neuron hybrid cells. *Neuroreport* 2:505-508.
- Sasaoka T, Ishihara H, Sawa T, Ishiki M, Morioka H, Imamura T, Usui I, Takata Y, Kobayashi M (1996) Functional importance of amino-terminal domain of Shc for interaction with insulin and epidermal growth factor receptors in phosphorylation-independent manner. *J Biol Chem* 271:20082-20087.
- Soeda Y, Tsuneki H, Muranaka H, Mori N, Hosoh S, Ichihara Y, Kagawa S, Wang X, Toyooka N, Takamura Y, Uwano T, Nishijo H, Wada T, Sasaoka T (2010) The inositol phosphatase SHIP2 negatively regulates insulin/IGF-I actions implicated in neuroprotection and memory function in mouse brain. *Mol Endocrinol* 24:1965-1977.
- Sorenson EJ et al. (2008) Subcutaneous IGF-1 is not beneficial in 2-year ALS trial. *Neurology* 71:1770-1775.
- Subramaniam S, Shahani N, Strelau J, Laliberte C, Brandt R, Kaplan D, Unsicker K (2005) Insulin-like growth factor 1 inhibits extracellular signal-regulated kinase to promote neuronal survival via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase A/c-Raf pathway. *J Neurosci* 25:2838-2852.
- Towbin H, Schoenenberger C, Ball R, Braun DG, Rosenfelder G (1984) Glycosphingolipid-blotting: an immunological detection procedure after separation by thin layer chromatography. *J Immunol Methods* 72:471-479.
- Tsai LK, Chen YC, Cheng WC, Ting CH, Dodge JC, Hwu WL, Cheng SH, Pardini MA (2012) IGF-1 delivery to CNS attenuates motor neuron cell death but does not improve motor function in type III SMA mice. *Neurobiol Dis* 45:272-279.
- Tseng YH, Ueki K, Kriauciunas KM, Kahn CR (2002) Differential roles of insulin receptor substrates in the anti-apoptotic function of insulin-like growth factor-1 and insulin. *J Biol Chem* 277:31601-31611.
- Vemuri GS, McMorris FA (1996) Oligodendrocytes and their precursors require phosphatidylinositol 3-kinase signaling for survival. *Development* 122:2529-2537.
- Wilczak N, de Vos RA, De Keyser J (2003) Free insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins 2, 5, and 6 in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 361:1007-1011.
- Yadav A, Kalita A, Dhillon S, Banerjee K (2005) JAK/STAT3 pathway is involved in survival of neurons in response to insulin-like growth factor and negatively regulated by suppressor of cytokine signaling-3. *J Biol Chem* 280:31830-31840.
- Yamazaki T, Chen S, Yu Y, Yan B, Haertlein TC, Carrasco MA, Tapia JC, Zhai B, Das R, Lalancette-Hebert M, Sharma A, Chandran S, Sullivan G, Nishimura AL, Shaw CE, Gygi SP, Schneider NA, Maniatis T, Reed R (2012) FUS-SMN Protein Interactions Link the Motor Neuron Diseases ALS and SMA. *Cell Rep*.
- Yin F, Ye F, Tan L, Liu K, Xuan Z, Zhang J, Wang W, Zhang Y, Jiang X, Zhang DY (2012) Alterations of signaling pathways in muscle tissues of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*.
- Zhang Z, Lotti F, Dittmar K, Younis I, Wan L, Kasim M, Dreyfuss G (2008) SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell* 133:585-600.

FIGURES LEGENDS

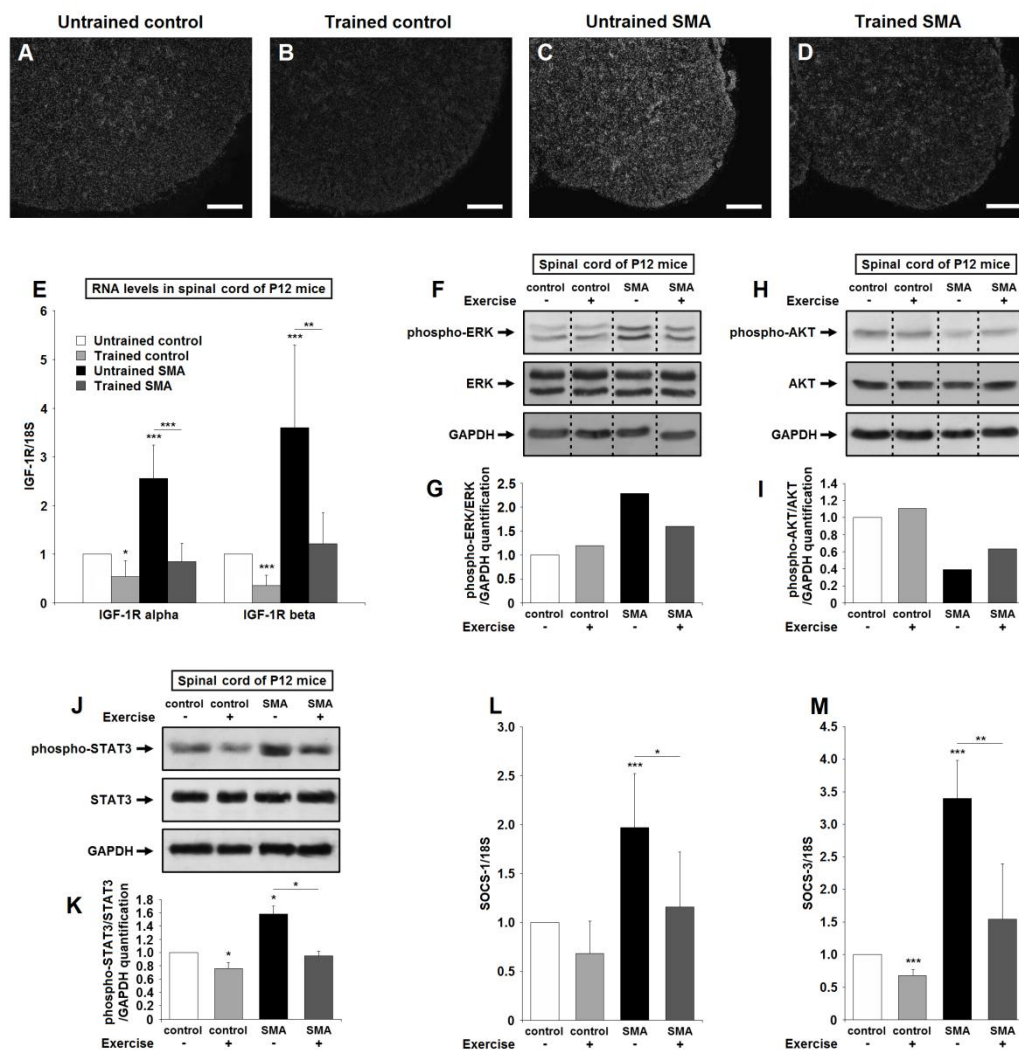


Figure 1

A, B, C and D. Detection of IGF-1R-positive expression in the lumbar spinal cord (L1-L5) of untrained control (A) and trained control (B) mice at 12 days of age, compared to untrained type 2 SMA-like mice (C) and trained type 2 SMA-like mice (D) at 12 days of age (n=10) (scale bar : 100 μ M). **E.** Quantification by real time RT PCR of IGF-1R alpha and IGF-1R beta transcripts normalized by 18S transcripts in the ventral lumbar spinal cord of sedentary and trained control mice at 12 days of age, compared to sedentary and trained type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=9). **F and G.** Western blot analysis (F) and quantification (G) of ERK protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of sedentary and trained control mice at 12 days of age, compared to sedentary and trained type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=1). **H and I.** Western blot analysis (H) and quantification (I) of AKT protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of sedentary and trained control mice at 12 days of age, compared to sedentary and trained type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=1). **J and K.** Western blot analysis (J) and quantification (K) of STAT3 protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of sedentary and trained control mice at 12 days of age, compared to sedentary and trained type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=2). **L and M.** Quantification by real time RT PCR of SOCS-1 (L) and SOCS-3 (M) transcripts normalized by 18S transcripts in the ventral lumbar spinal cord of sedentary and trained control mice at 12 days of age, compared to sedentary and trained type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=9). Data are displayed as mean \pm SEM. (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$).

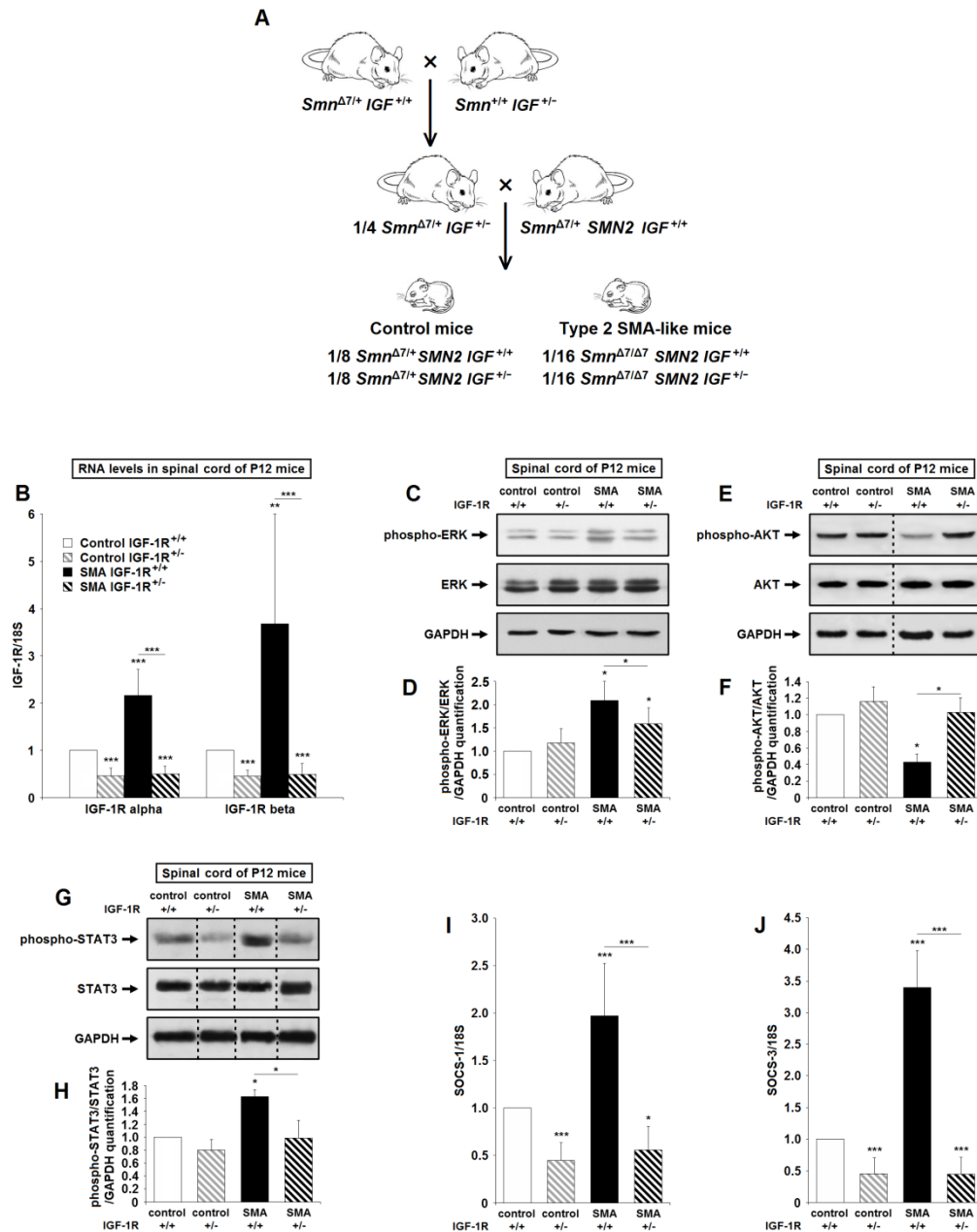


Figure 2

A. Crossings to obtain IGF-1R^{+/-} type 2 SMA-like mice. **B.** Quantification by real time RT PCR of IGF-1R alpha and IGF-1R beta transcripts normalized by 18S transcripts in the ventral lumbar spinal cord of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=9). **C and D.** Western blot analysis (**B**) and quantification (**C**) of ERK protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=6). **E and F.** Western blot analysis (**D**) and quantification (**E**) of AKT protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=6). **G and H.** Western blot analysis (**G**) and quantification (**H**) of STAT3 protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=2). **I and J.** Quantification by real time RT PCR of SOCS-1 (**I**) and SOCS-3 (**J**) transcripts normalized by 18S transcripts in the ventral lumbar spinal cord of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=9).

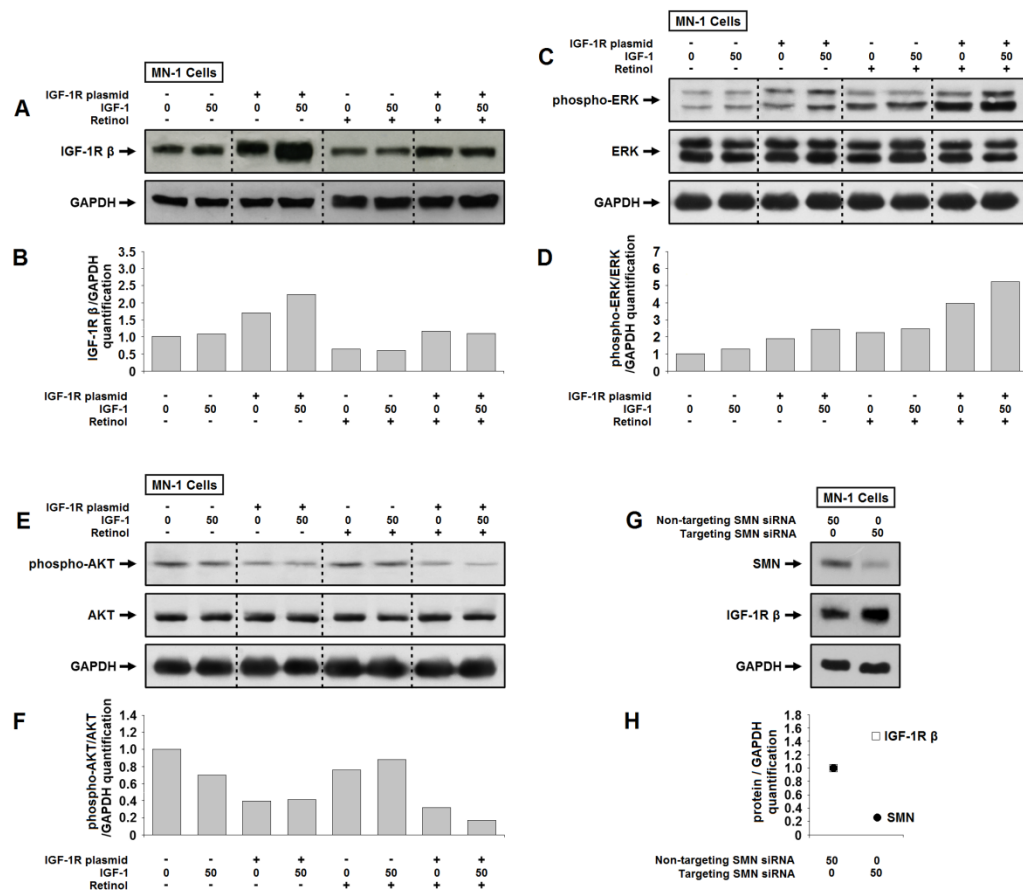


Figure 3

A and B. Western blot analysis (**A**) and quantification (**B**) of IGF-1R beta protein expression in MN-1 cells, transfected or not with a IGF-1R-containing plasmid and in presence or not of Retinol and IGF-1 (n=1). **C and D.** Western blot analysis (**C**) and quantification (**D**) of ERK protein phosphorylation in MN-1 cells, transfected or not with a IGF-1R-containing plasmid and in presence or not of Retinol and IGF-1 (n=1). **E and F.** Western blot analysis (**E**) and quantification (**F**) of AKT protein phosphorylation in MN-1 cells, transfected or not with a IGF-1R-containing plasmid and in presence or not of Retinol and IGF-1 (n=1). **G and H.** Western blot analysis (**G**) and quantification (**H**) of SMN and IGF-1R beta proteins expression in MN-1 cells, transfected with a targeting or non-targeting SMN siRNA (n=1). Data are displayed as mean \pm SEM. (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$).

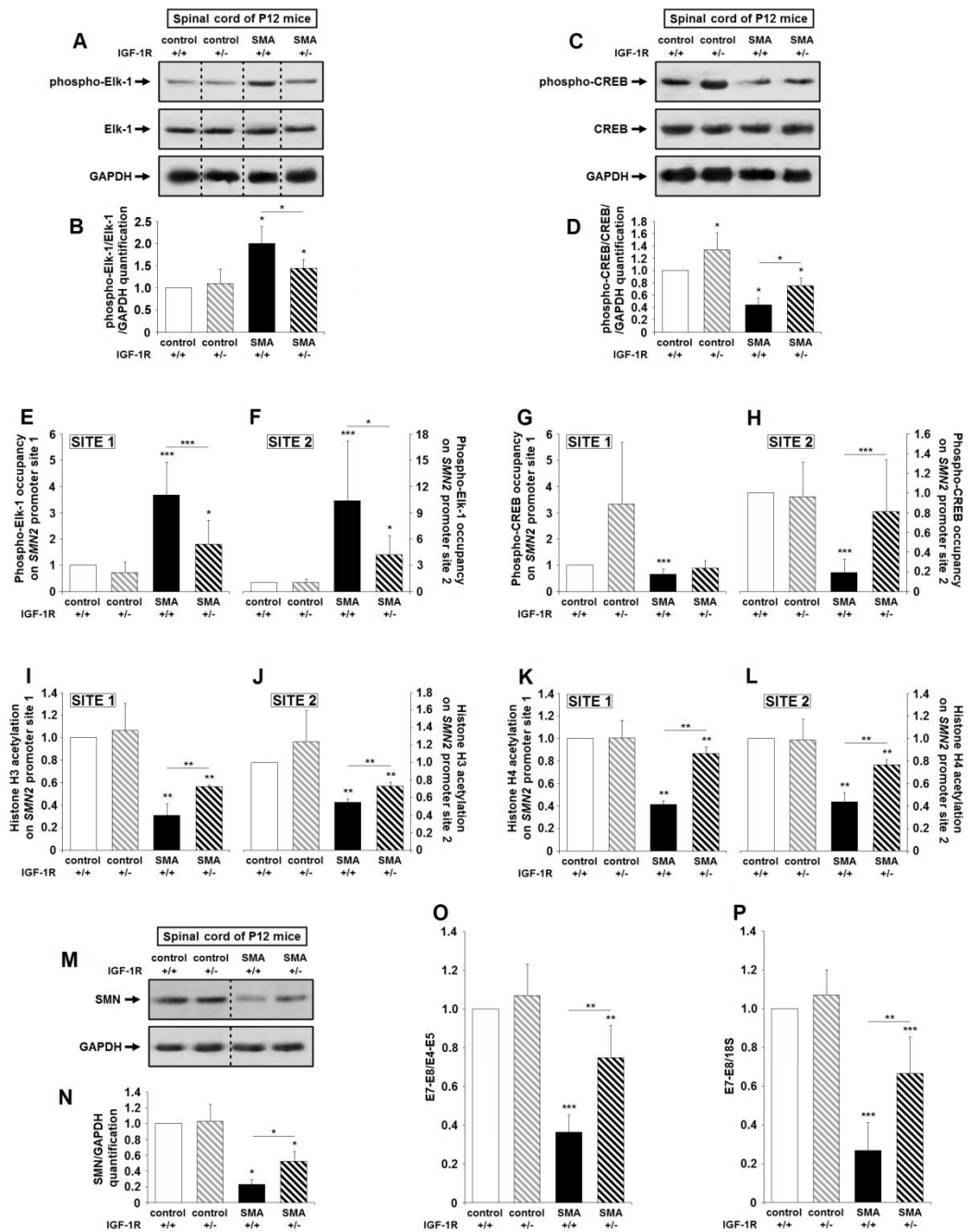


Figure 4

A and B. Western blot analysis (**A**) and quantification (**B**) of Elk-1 protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=4). **C and D.** Western blot analysis (**C**) and quantification (**D**) of CREB protein phosphorylation in the ventral lumbar spinal cord of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=5). **E, F, G and H.** ChIP analysis of Phospho-Elk-1 (**E and F**) and Phospho-CREB (**G and H**) in the ventral lumbar spinal cord of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=12). Quantitative real time PCR was performed to detect SMN2 promoter site 1 (**E and G**) and site 2 (**F and H**). **I, J, K and L.** ChIP analysis of Histone H3 (**I and J**) and H4 (**K and L**) acetylation in the ventral lumbar spinal cord of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=9). Quantitative real time PCR was performed to detect SMN2 promoter site 1 (**I and K**) and site 2 (**J and L**). **M and N.** Western blot analysis (**M**) and quantification (**N**) of SMN protein expression in the ventral lumbar spinal cord of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=3). **O and P.** Quantification by real time RT PCR of exon 7-exon 8 (E7-E8)-segment containing SMN transcripts normalized either by exon 4-exon 5 (E4-E5)-segment containing SMN transcripts (**O**) or by 18S transcripts (**P**) in the ventral lumbar spinal cord of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=9). Data are displayed as mean \pm SEM. (*, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001).

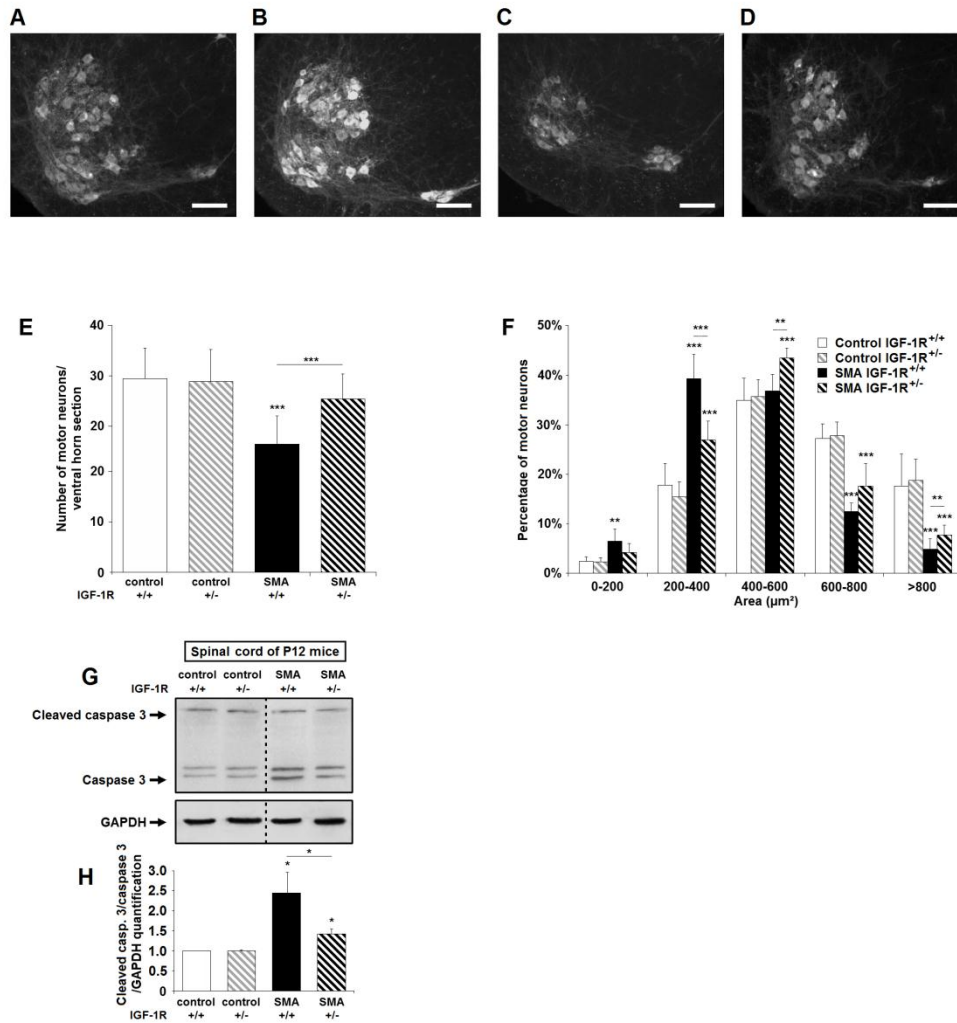


Figure 5

A, B, C and D. Immunodetection of ChAT-positive motor neurons in the lumbar spinal cord (L1-L5) of IGF-1R^{+/+} control (A) and IGF-1R^{-/-} control (B) mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} type 2 SMA-like mice (C) and IGF-1R^{-/-} type 2 SMA-like mice (D) at 12 days of age (n=10) (scale bar : 100 μ m). E, and F. Quantitative analysis of the number (E) and the cell body area (F) of motor neurons per ventral horn in the ventral lumbar spinal cord of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=10). G, and H. Western blot analysis (G) and quantification (H) of cleaved caspase-3 protein expression in the ventral lumbar spinal cord of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=2). Data are displayed as mean \pm SEM. (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$).

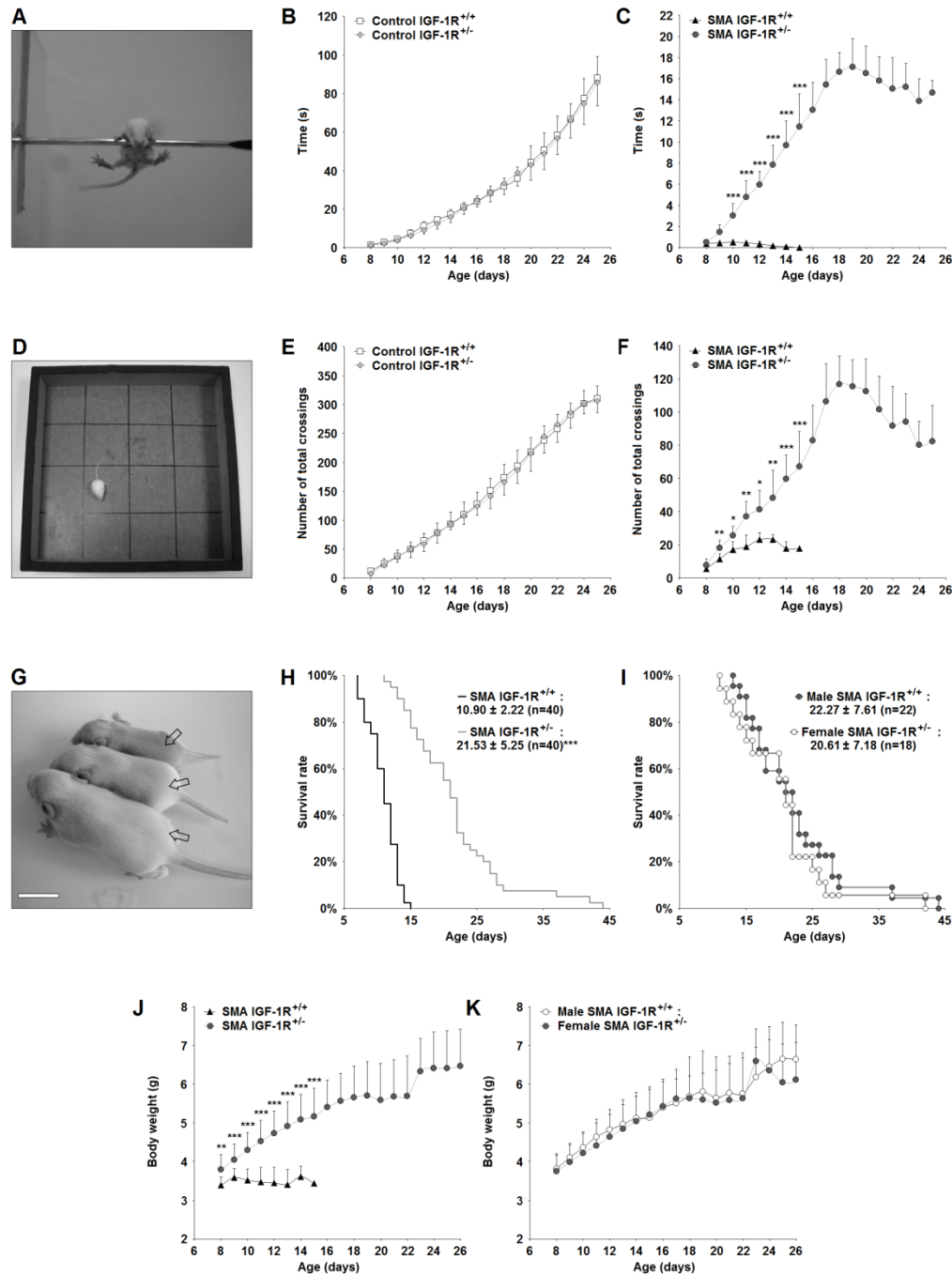


Figure 6

A. Picture showing a IGF-1R^{+/+} SMA-like mice during a grip test on a metal rod, at 12 days of age. **B and C.** Grip time of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} control mice at 12 days of age (**B**) and IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} SMA-like mice at 12 days of age (**C**) (n=20 for each group). **D.** Picture showing a IGF-1R^{+/+} SMA-like mice during an open field test, at 12 days of age. **E and F.** Total number of crossings during 5 min in the open field (**D**) test for IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} control mice at 12 days of age (**E**) and IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} SMA-like mice at 12 days of age (**F**) (n=20 for each group). **G.** Phenotype of IGF-1R^{+/+} control mice (Control) compared to IGF-1R^{+/+} type 2 SMA-like mice and IGF-1R^{+/-} SMA-like mice at 12 days of age (scale bar : 1cm). **H.** Lifespan of IGF-1R^{+/+} type 2 SMA-like mice (n=40) compared to IGF-1R^{+/-} type 2 SMA-like mice (n=40). **I.** Lifespan of male IGF-1R^{+/+} type 2 SMA-like mice (n=22) compared to female IGF-1R^{+/+} type 2 SMA-like mice (n=18). **J.** Weight curve of IGF-1R^{+/+} type 2 SMA-like mice (n=40) compared to IGF-1R^{+/-} type 2 SMA-like mice (n=40). **K.** Weight curve of male IGF-1R^{+/+} type 2 SMA-like mice (n=22) compared to female IGF-1R^{+/+} type 2 SMA-like mice (n=18). Data are displayed as mean ± SEM. (*, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001).

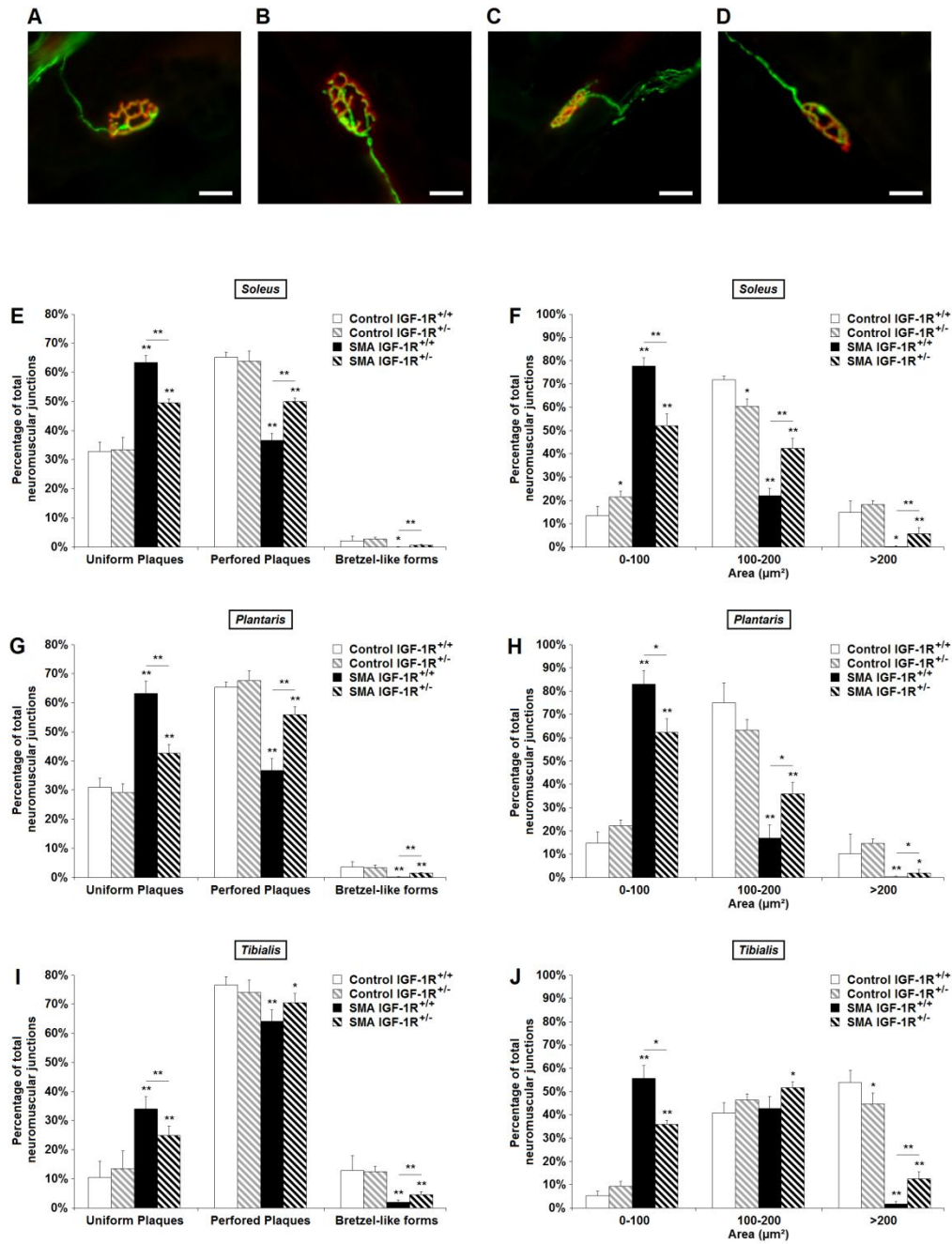


Figure 7

A, B, C and D. Motor end-plates labeling with α -bungarotoxin, anti-neuifilament and anti-synaptophysin antibodies in the soleus of IGF-1R^{+/+} control mice (A), IGF-1R^{-/-} control mice (B), IGF-1R^{+/+} SMA-like mice (C) IGF-1R^{-/-} SMA-like mice (D), at 12 days of age showing a typical pretzel (A and B), perforated (D) and immature (C) type of NMJ (Scale bar : 25 μ m). E and F. Determination of the neuromuscular junction maturation (E) and area (F) in the soleus muscle, from IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=5). G and H. Determination of the neuromuscular junction maturation (G) and area (H) in the plantaris muscle, from IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=5). I and J. Determination of the neuromuscular junction maturation (I) and area (J) in the tibialis muscle, from IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{-/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=5). Data are displayed as mean \pm SEM. (*, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001).

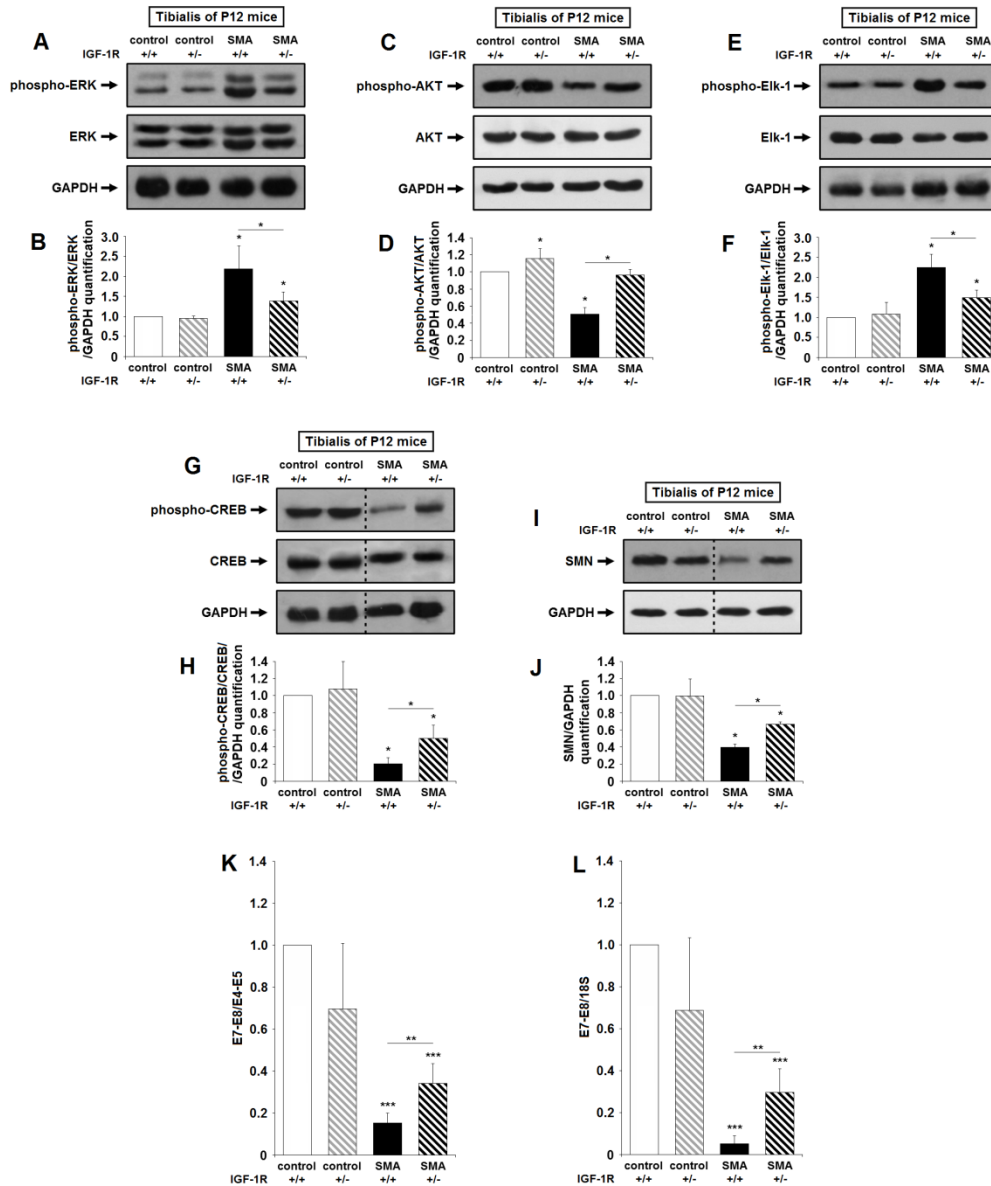


Figure 8

A and B. Western blot analysis (A) and quantification (B) of ERK protein phosphorylation in the *tibialis* muscle of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=4). **C and D.** Western blot analysis (C) and quantification (D) of AKT protein phosphorylation in the *tibialis* muscle of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=3). **E and F.** Western blot analysis (E) and quantification (F) of Elk-1 protein phosphorylation in the *tibialis* muscle of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=4). **G and H.** Western blot analysis (G) and quantification (H) of CREB protein phosphorylation in the *tibialis* muscle of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=3). **I and J.** Western blot analysis (I) and quantification (J) of SMN protein expression in the *tibialis* muscle of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=3). **K and L.** Quantification by real time RT PCR of exon 7-exon 8 (E7-E8)-segment containing SMN transcripts normalized either by exon 4-exon 5 (E4-E5)-segment containing SMN transcripts (K) or by 18S transcripts (L) in the *tibialis* muscle of IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} control mice at 12 days of age, compared to IGF-1R^{+/+} and IGF-1R^{+/-} type 2 SMA-like mice at 12 days of age (n=6). Data are displayed as mean \pm SEM. (*, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001).

5.2. Conclusions de l'article 3

Dans cet article, nous avons montré que la diminution du récepteur à l'IGF-1 était bénéfique pour les souris mimant la SMA de type II. L'espérance de vie, ainsi que la prise de poids, est augmentée chez les souris malades IGF-1R^{+/-}, mâles et femelles, comparées aux souris malades IGF-1R^{+/+}. De plus, cette diminution permet une augmentation significative de la force musculaire et de l'activité spontanée de ces souris.

Du point de vue cellulaire, nos résultats suggèrent que la diminution de l'IGF-1R a un potentiel important de neuroprotection. Ainsi, les motoneurones des souris IGF-1R^{+/-} mimant la SMA de type II sont moins affectées par l'apoptose que ceux des souris IGF-1R^{+/+} malades. En répercussion, les JNMs des souris IGF-1R^{+/-} sont plus larges et moins touchées par le retard de maturation caractéristique des SMA.

L'analyse des cascades de signalisation intracellulaire a révélé, encore une fois, une compétition entre les voies MEK/ERK/Elk-1 et AKT/CREB pour la régulation de l'expression du gène *SMN2*. En outre, nous avons observé une réduction drastique de la phosphorylation de STAT3 et de l'expression de SOCS-1 et SOCS-3 ; des facteurs qui sont surexprimés dans la moelle épinière des souris mimant la SMA de type II. Nos résultats rejoignent ceux de l'équipe de Tetsuji Naka qui a démontré que la surexpression de SOCS-1 augmentait la phosphorylation de MEK et diminuait la phosphorylation de AKT induite par l'IGF-1 dans des cultures de cellules musculaires (Inaba et coll., *Biochem Biophys Res Commun*, 2005).

De manière surprenante, la diminution constitutive de l'IGF-1R modifie à la fois le niveau d'expression du gène *SMN2* et son profil d'épissage. En effet, dans la moelle épinière lombaire et le *tibialis* de ces souris malades, le niveau d'expression du gène *SMN2* est doublé et l'inclusion de l'exon 7 est favorisée dans les transcrits SMN. En conséquence, la protéine SMN est fortement augmentée chez ces souris.

Par ailleurs, nous avons prouvé *in vitro* et *in vivo* qu'une surexpression de l'IGF-1R activait la voie MEK/ERK/Elk-1 au détriment de la voie AKT/CREB, conduisant à une diminution de SMN.

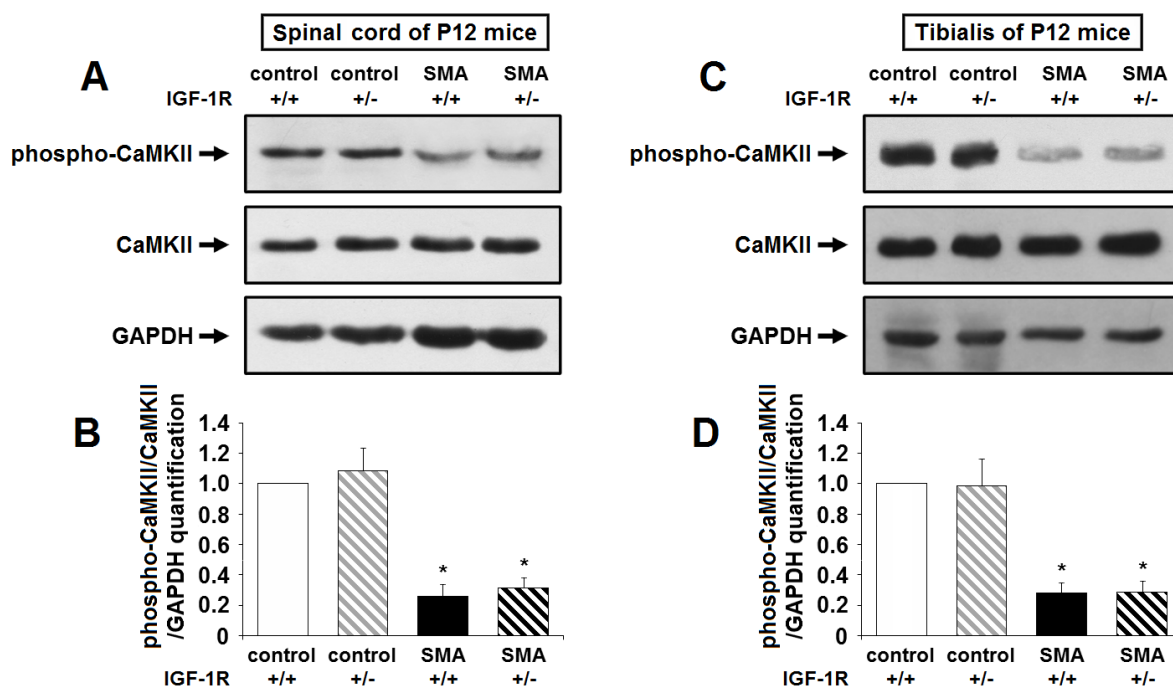
Cet article met donc en évidence, pour la première fois, le fait que le taux de récepteur à l'IGF-1 à la membrane était crucial dans un contexte de SMA. En effet, cette réduction a un impact significatif sur les voies de signalisation et la neuroprotection induite par IGF-1. Vraisemblablement, une part des effets bénéfiques de l'exercice physique est reliée par la diminution de ce récepteur à la surface des cellules nerveuses et musculaires sollicitées.

5.3. Résultats complémentaires à l'article 3

5.3.1. Évaluation de la phosphorylation de CaMKII dans la moelle épinière et les *tibialis* de souris invalidées partiellement pour l'IGF-1R

Nous avons constaté, dans les articles 1 et 2, que la voie AKT/CREB était constitutivement diminuée dans la moelle épinière des souris mimant la SMA de type I et II. Or, l'activation des NMDARs ou l'inhibition de la phosphorylation de ERK réactive cette voie moléculaire de manière calcium dépendante. En effet, ces deux traitements déclenchent une entrée de calcium qui aboutit à la phosphorylation de CaMKII puis la réactivation de la voie AKT/CREB et, au final, l'augmentation de la protéine SMN.

Nous avons constaté, dans l'article 3, que la diminution de l'expression des IGF-1Rs dans la moelle épinière et les *tibialis* des souris mimant la SMA réactivait la voie AKT/CREB. C'est pourquoi, nous avons évalué le niveau de phosphorylation de CaMKII dans ce contexte.



A et B. Analyse par western immunoblot et quantification de la phosphorylation de la protéine CaMKII dans la moelle épinière lombaire ventrale de souris contrôles *IGF-1R*^{+/+} et *IGF-1R*^{+/-} ou mimant la SMA de type II *IGF-1R*^{+/+} et *IGF-1R*^{+/-} (n=3). **C et D.** Analyse par western immunoblot et quantification de la phosphorylation de la protéine CaMKII dans les *tibialis* de souris contrôles *IGF-1R*^{+/+} et *IGF-1R*^{+/-} ou mimant la SMA de type II *IGF-1R*^{+/+} et *IGF-1R*^{+/-} (n=3).

Nous avons observé que CaMKII était moins activée dans la moelle épinière et les *tibialis* de souris mimant la SMA. En revanche la diminution de l'expression des IGF-1Rs n'induit aucune modification de la phosphorylation de CaMKII chez les souris contrôles et mimant la SMA. Dans ce contexte la réactivation de la voie AKT/CREB est indépendante du calcium.

DISCUSSION

I. L'activation des récepteurs au NMDA aboutit à une accélération de la maturation de l'unité motrice et à l'augmentation de l'expression de SMN dans la moelle épinière de souris mimant la SMA de type I et de type II.

Le développement des neurones dans plusieurs régions du système nerveux est dépendant de l'activité (Gallo et coll., *J Neurosci*, 1987; Crair et Malenka, *Nature*, 1995; Kirkwood et Bear, *Biol Res*, 1995). Il en va de même pour les motoneurones qui subissent, sous l'influence de l'activation des NMDARs, des changements moléculaires et morphologiques au cours de la période postnatale précoce (Kalb et Hockfield, *Brain Res Brain Res Rev*, 1992; Kalb, *Development*, 1994). En outre, il a été démontré qu'un traitement chronique au NMDA assurait la survie des motoneurones et pouvait augmenter l'expression du gène *SMN* dans des cultures de cellules nerveuses ; alors qu'une inhibition spécifique des NMDARs induisait une mort neuronale massive (Llado et coll., *J Neurosci*, 1999; Andreassi et coll., *Neurogenetics*, 2002).

Nous avons démontré que l'accélération de la maturation des motoneurones influait directement sur le développement de l'ensemble de l'unité motrice, notamment la maturation des muscles squelettiques. Sachant que des anomalies du développement de l'unité motrice ont été constatées chez les patients atteints de SMA de type I (Martinez-Hernandez et coll., *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009) et dans des modèles de souris mimant la SMA (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008; Kariya et coll., *Hum Mol Genet*, 2008; Kong et coll., *J Neurosci*, 2009), ces données nous offrent un nouvel angle d'approche dans le traitement de la SMA. De plus, il a été observé, dans le cadre de la SMA, que l'activité électrique des motoneurones était trop faible pour assurer le développement correct des unités motrices. Par conséquent, cela aggrave les effets liés à l'absence de la protéine SMN.

Dans ce contexte, nous avons déterminé qu'un traitement avec une dose adéquate de NMDA (5 pmol/g/j), administrée en intrathécal, accélérerait la maturation postnatale de l'ensemble de l'unité motrice et augmentait de manière accrue l'expression de la protéine SMN. Cependant, bien que l'atrophie musculaire chez les souris mimant la SMA de type II, probablement liée à une perte motoneuronale, soit endiguée par le traitement au NMDA, l'aplasie musculaire perdure. Ce résultat suggère que l'aplasie provient d'événements embryonnaires précoces et le nombre de fibres musculaires n'augmentera plus après la naissance. Le manque de protéine SMN serait, sans doute, à l'origine de ce défaut de prolifération ou de différenciation des myoblastes (Cifuentes-Diaz et coll., *J Cell Biol*, 2001). Par ailleurs, l'activation adéquate des récepteurs au NMDA permet d'augmenter la durée de vie des souris mimant la SMA. Ainsi, les souris mimant la SMA de type I présentent une nette augmentation de leur durée de vie, passant ainsi de 1,65 jours ($\pm 0,62$ j) pour les souris malades traitées avec un placebo à 5 jours ($\pm 1,87$ j) pour celles traitées avec du NMDA (Article 1 fig. 4). De même, la durée de vie des souris mimant la SMA de type II passe de 11,36 jours ($\pm 1,92$ j) pour celles traitées avec un placebo à 18,96 jours ($\pm 5,13$ j) pour celles traitées avec du NMDA (Article 1 fig. 4). Ce gain d'espérance de vie de 66,9% observé sur ce modèle est plus important que celui de 39% observé chez les souris traitées au sodium butyrate, molécule actuellement testée cliniquement chez l'homme (Chang et coll., *Proc Natl*

Acad Sci U S A, 2001) et que celui de 57,3% observé chez les souris entraînées à la course (Grondard et coll., *J Neurosci*, 2005).

En outre, le traitement avec une dose adéquate de NMDA permet de contrer la perte progressive de poids des souris quelque soit le type de SMA mimée et semble ralentir la progression de la maladie (Article 1 fig. 4). De même, nous avons constaté que les souris mimant la SMA de type II présentaient une amélioration des capacités motrices. En premier lieu, les souriceaux malades traités avec du NMDA ont de meilleurs scores au test de grip. Ils sont capables de maintenir beaucoup plus longtemps leur poids sur une tige métallique, dénotant ainsi une augmentation de leur force musculaire. En second lieu, les souriceaux malades traités avec du NMDA montrent une augmentation de l'activité spontanée et exploratoire lors du test de l'openfield (Article 1 fig. 4). Il convient de noter que ce traitement au NMDA imite parfaitement les effets de l'exercice obtenus dans la même souche de souris (Grondard et coll., *J Neurosci*, 2005; Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008). Ce qui suggère l'activation de mécanismes intracellulaires communs.

En revanche, un traitement avec une haute dose de NMDA (25 pmol/g/j), accélère la maturation postnatale des fibres musculaires et des jonctions neuromusculaires mais ne réussit pas à améliorer l'expression de SMN ou à atténuer les symptômes de la maladie chez les souris mimant la SMA de type II. Néanmoins, ces résultats suggèrent que la protéine SMN n'est pas directement impliquée dans l'accélération du développement de l'unité motrice induite par le NMDA.

Dans tous les cas, les modifications très rapides au niveau des fibres musculaires, des neurones et des jonctions neuromusculaires traduisent d'une grande plasticité dans les premiers jours postnataux. Les processus cellulaires et moléculaires sont, selon toute vraisemblance, particulièrement actifs durant cette période.

II. L'inhibition de la voie MEK/ERK/Elk-1 aboutit à l'augmentation de l'expression de SMN dans la moelle épinière de souris mimant la SMA de type I et dans des myotubes provenant de patients atteints de SMA de type II.

Ces dernières années beaucoup d'efforts ont été déployés pour identifier les mécanismes moléculaires capables d'augmenter SMN par sa transcription, sa stabilisation ou l'inclusion de l'exon 7. Cependant, la plupart des composés qui augmente l'expression de SMN *in vitro* ou atténue les symptômes de la SMA chez les modèles animaux se sont soldés par des échecs lors des essais cliniques chez les patients (Bebbee et coll., *Front Biosci*, 2010). Notre hypothèse est que de meilleurs résultats pourraient être obtenus en modulant une voie de signalisation qui augmenterait l'expression du gène *SMN2* et favoriserait l'activation de voies anti-apoptotique.

Nous avons constaté que la faible expression de SMN dans la moelle épinière des souris mimant la SMA de type I et II était corrélée avec la suractivation de la kinase ERK (Article 1 fig. 5 et 7). Afin de tester le lien causal entre l'activation de la voie ERK et le niveau d'expression de SMN, nous avons analysé les effets d'une inhibition *in vivo* de ERK dans des souris mimant la SMA de type I. Nous montrons que l'inhibition pharmacologique de la voie de signalisation MEK/ERK/Elk-1 pourrait être bénéfique dans un contexte de SMA. En effet, nous avons conclu que cette inhibition augmentait de manière significative la

concentration en protéine SMN. Ainsi, nous avons constaté que le U0126, administré en intrathécal, augmentait le nombre de gems dans les motoneurones et le niveau de protéine SMN dans la moelle épinière, le cerveau et le *tibialis* (Article 2 fig. 2). Nous avons déterminé que le U0126 augmentait dans la moelle épinière le nombre de transcrit SMN possédant l'exon 7 en augmentant la transcription générale du gène *SMN2*. Ainsi leur proportion passe de 26% chez les souris malades traitées avec un placebo à 65% chez celles traitées avec du U0126. L'AZD6244, quant à lui, administré par voie orale, augmente le niveau de protéine SMN dans la moelle épinière, le cerveau, le cœur, le diaphragme et le *tibialis*. De plus, l'inhibition de ERK, dans la phase symptomatique de la maladie, conduit à l'activation de la voie AKT/CREB. Ce qui, au final, augmente de manière significative la durée de vie des souris mimant la SMA par 2,8 fois pour le U0126 (Article 2 fig. 7) et 3,5 fois pour l'AZD6244 (Article 2 fig. 8). De plus, le U0126 améliore les capacités motrices des souris mimant la SMA de type I. Ainsi, nous avons observé que les souris malades traitées au U0126 retrouvaient la capacité de se redresser après avoir été placées sur le flanc et développaient un regain d'activité et mobilité durant le test de l'open field (Article 2 fig. 7).

En outre, l'effet de l'inhibition de ERK sur l'expression de la protéine SMN a été confirmé dans des myotubes, cellules musculaires différenciées, issues de patients atteints de SMA. A noter que l'inhibition de ERK n'induit pas d'effet apparent sur les myoblastes.

III. La diminution de moitié des récepteurs à l'IGF-1 aboutit à une accélération de la maturation de l'unité motrice et à l'augmentation de l'expression de SMN dans la moelle épinière de souris mimant la SMA de type II.

L'invalidation partielle d'IGF1R allonge de deux fois la durée de vie des souris mimant la SMA de type II. Les souris malades IGF-1R^{+/+} vivent en moyenne 10,90 jours (\pm 2,22 j) tandis que les souris malades IGF-1R^{+/-} vivent en moyenne 21,53 jours (\pm 5,25 j). Contrairement à l'étude d'origine sur les souris contrôles IGF^{+/-} (Holzenberger et coll., *Nature*, 2003), nous n'avons pas observé de différence de durée de vie significative entre les mâles et les femelles (males 22,27 jours \pm 7,61 j et femelles 20,61 jours \pm 7,18 j). Cet allongement est associé avec une augmentation de la masse corporelle, une accélération de la maturation des jonctions neuromusculaires et une amélioration des capacités motrices des souris malades. De plus, la diminution de moitié de la concentration en IGF-1Rs augmente l'expression de la protéine SMN dans la moelle épinière et le muscle. Nous avons mis en évidence que cette augmentation était due à la fois à une augmentation de la transcription du gène *SMN2* et à l'augmentation de la proportion des transcrits SMN ayant l'exon 7.

IV. La voie PI3K/AKT/CREB constitue un des acteurs majeurs dans la neuroprotection des motoneurones de la moelle épinière.

Dans nos trois conditions, l'activation des NMDARs, l'inhibition de ERK et l'invalidation partielle d'IGF-1R, nous avons constaté que la neuroprotection était toujours corrélée à une réactivation de la voie AKT/CREB. Nous avons démontré qu'une activation directe et adéquate des NMDARs, dans la moelle épinière de souris mimant la SMA de type II, peut protéger efficacement les motoneurones de la mort cellulaire. Nous avons constaté une perte de 33% des motoneurones chez les souris mimant la SMA de type II par rapport aux souris contrôles. La perte se limite à 18% avec un traitement au NMDA (Article 1 fig. 3). Reste à savoir si le NMDA active de manière directe la neuroprotection en se fixant sur les

NMDARs des motoneurones ou de manière indirecte par le biais d'autres cellules nerveuses possèdent des NMDARs et stimulant les motoneurones. A l'inverse une trop forte activation des NMDARs, *in vivo*, peut avoir un effet opposé et promouvoir des voies pro-apoptotiques (Article 1 fig. sup. 3). Ces données sont en accord avec les études antérieures montrant les effets neuroprotecteurs de faibles doses de NMDA dans le cerveau et la moelle épinière embryonnaire (Kalb et Hockfield, *Brain Res Brain Res Rev*, 1992; Kalb, *Development*, 1994; Ikonomidou et coll., *Science*, 1999; Ikonomidou et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; Hardingham et Bading, *Trends Neurosci*, 2003) et les effets toxiques de fortes doses (Choi, *Neuron*, 1988; Olney, *Prog Brain Res*, 1990; Doble, *Pharmacol Ther*, 1999; McCrate et Kaspar, *Neuromolecular Med*, 2008).

Nous avons également constaté que l'inhibition de ERK, dans la moelle des souris mimant la SMA de type I, limite efficacement la perte des motoneurones lombaires dès les premières injections. En effet, la perte des motoneurones lombaires s'élève déjà à 31% à P2 dans la moelle de souris mimant la SMA de type I.

L'inhibition de ERK limite, en quelques heures, cette perte de 12% à P2 (Article 2 fig. 7). De même, la diminution de moitié des IGF-1Rs contrecarre totalement la perte des motoneurones lombaires chez les SMA de type II à P12. (Article 3 fig. 5).

La survie des motoneurones de la moelle épinière des souris mimant la SMA se produit probablement grâce à l'activation de la voie AKT/CREB. Cette voie est considérée comme anti-apoptotique dans de nombreux systèmes, tel que le système nerveux central. En effet, les principales cibles de la forme active de AKT sont impliquées dans la régulation de la survie cellulaire, comme les membres de la famille Bcl-2 ou les facteurs de transcriptions Forkhead et CREB. En outre, la phosphorylation de AKT maintient la survie des neurones en absence de facteurs neurotrophiques et des neurones dominant négatifs pour AKT ne peuvent survivre, même en présence de facteurs de survie (Eves et coll., *Mol Cell Biol*, 1998). De plus, AKT phosphorylé assure le bon développement des épines dendritiques et des synapses (Majumdar et coll., *Mol Cell Neurosci*, 2011) (*molecular and cellular neuroscience*). Dans notre contexte, nous avons constaté une diminution de la forme phosphorylée de AKT dans les moelles épinières des souris mimant la SMA (Article 1 fig. 7 ; article 2 fig. 4 et 8 et article 3 fig. 1 et 2). Cette anomalie étant retrouvée dans tous nos modèles murins, suggère que la diminution de la forme active de AKT pourrait être une caractéristique générale de SMA.

Par conséquent, les effets bénéfiques observés dans les articles 1, 2 et 3 (1 : induits par l'activation des NMDARs, 2 : induits par l'inhibition de ERK et 3 : induits par l'invalidation partielle des IGF-1R), dans la moelle épinière des souris mimant la SMA, pourraient être liés à l'activation de AKT qui inhiberait l'activation en cascade des caspases et la mort des motoneurones. Cette hypothèse est étayée par le fait qu'une dose toxique de NMDA régule négativement la phosphorylation de AKT dans les moelles épinières de souris contrôles et mimant la SMA et accroît la proportion de caspase 3 active (Article 1 fig. sup. 3).

Par ailleurs, il a également été prouvé que CREB, un des substrats de AKT, favorisait la survie neuronale (Bonni et coll., *Science*, 1999; Riccio et coll., *Science*, 1999). Par exemple, CREB active la transcription du gène codant pour BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) (Finkbeiner et coll., *Neuron*, 1997; Tao et coll., *Neuron*, 1998), une molécule impliquée dans la survie et la différenciation des populations neuronales (Alderson

et coll., *Neuron*, 1990; Ghosh et coll., *Science*, 1994; Mamounas et coll., *J Neurosci*, 1995). Or nous avons également constaté une diminution de la forme phosphorylée de CREB dans les moelles épinières des souris mimant la SMA de type I et II (Article 1 fig. 8 ; article 2 fig. 2 et article 3 fig. 4). L'ensemble de ces résultats, semble indiquer que la mort des motoneurones dans un contexte de SMA serait une conséquence d'une désactivation constitutive de la cascade AKT/CREB. A l'inverse la réactivation de cette voie déclencherait une neuroprotection des motoneurones lombaires.

V. La modulation des voies en compétition MEK/ERK/Elk-1 et PI3K/AKT/CREB peut induire une augmentation de la transcription des transgènes *SMN2* et/ou une modification du profil d'épissage des transcrits provenant de *SMN2*.

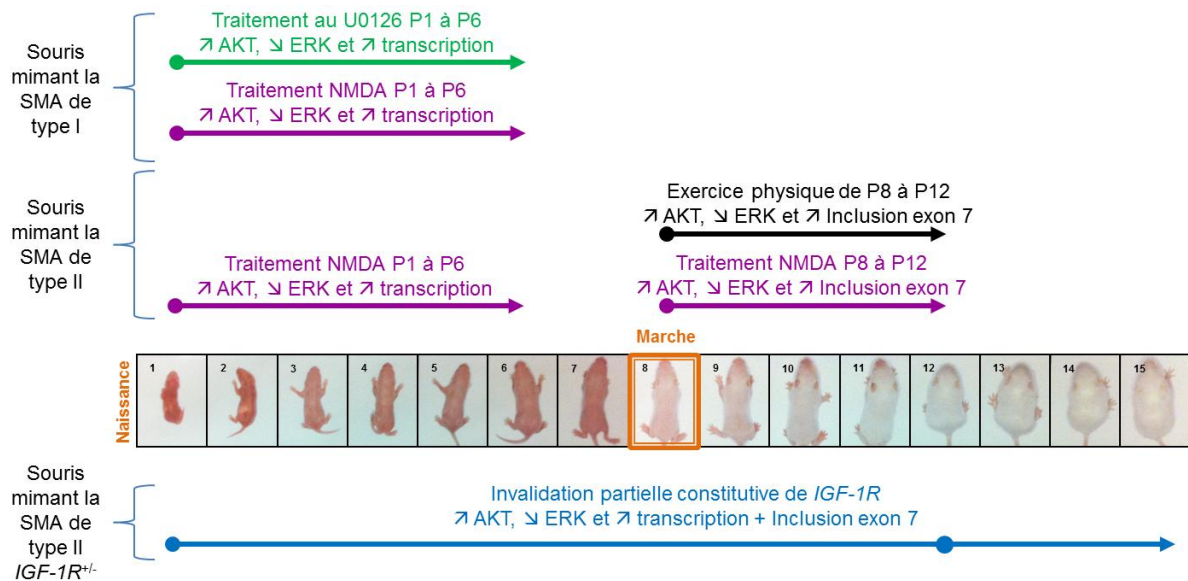


Figure 40 : modulation de l'expression du gène *SMN2* dans les différents modèles de souris mimant la SMA et en fonction des traitements présentés dans les articles 1,2 et 3.

La caractérisation complète des voies intracellulaires activées *in vivo* en aval des NMDARs conduisant à l'augmentation de la protéine SMN, nous a amené à constater que, dans la moelle épinière ventrale de souris mimant la SMA, la voie de signalisation PI3K/AKT était réactivée de manière calcium dépendante. Cette voie conduit à la phosphorylation de CREB puis à l'expression de la protéine SMN. En revanche, la voie des MAP kinase n'est pas activée. Ce dernier résultat contraste avec les observations réalisées dans des cultures de neurones corticaux où la phosphorylation de CREB suite à l'activation des NMDARs dépend de ERK (Lee et coll., *J Neurosci*, 2005). Cela suggère qu'il existe une spécificité cellulaire pour l'activation des voies de signalisation en aval des NMDARs.

Le traitement au NMDA conduit à une augmentation significative du taux de protéine SMN dans la moelle épinière des souris mimant la SMA. Ces données *in vivo* sont en accord avec les résultats réalisés sur des cultures de cellules neuronales contrôles, montrant que l'activation des NMDARs induit la transcription des gènes SMN (Andreassi et coll., *Neurogenetics*, 2002). Cependant, il est intéressant de constater que dans la souche de souris mimant la SMA de type I, l'activation NMDAR aboutit exclusivement à l'augmentation de la transcription du gène *SMN2* ; alors que dans la souche de souris mimant la SMA de

type II, cette activation aboutit exclusivement à la modification post-transcriptionnelle des transcrits SMN2 (Article 1 fig. 5). De même, l'inhibition de ERK conduit, en l'espace de 2h, exclusivement à l'augmentation de la transcription du gène SMN2 chez les souris mimant la SMA de type I (Article 2 fig. 1).

Lors d'analyses complémentaires nous avons déterminé que ce phénomène n'était pas lié aux caractéristiques des transgènes SMN2 utilisées dans chaque modèle. L'effet différentiel des NMDARs est lié à la période d'administration du traitement. En effet, l'administration de NMDA immédiatement après la naissance, chez les souris mimant la SMA de type II, déclenche également une augmentation de la transcription du gène SMN2 (Données complémentaires de l'article 1). En revanche, l'administration à partir de P8, chez les souris mimant la SMA de type II, modifie le profil d'épissage des transcrits SMN2, comme observé lors de l'exercice physique. L'ensemble de ces résultats suggère que les mécanismes moléculaires modulant l'expression de SMN2, chez les souris mimant la SMA, varient entre les premiers stades postnatals et l'acquisition de la marche à P8. Cet effet s'inscrit dans la lignée des observations sur les différentes régulations du gène SMN au cours du développement (Germain-Desprez et coll., *Gene*, 2001; Gabanella et coll., *Hum Mol Genet*, 2005). Ce qui alimente l'idée que différents mécanismes moléculaires, comme des facteurs agissant en trans ou des événements agissant en cis, sont fonctionnels durant des intervalles spécifiques de la maturation postnatale des motoneurones. A noter, qu'une part des mécanismes aboutissant à l'augmentation de la transcription de SMN2 doit être maintenue chez les souris mimant la SMA de type II *IGF-1R^{+/-}*. En effet, on retrouve une augmentation de la transcription des gènes SMN2 et une augmentation de l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN dans la moelle et le muscle de ces souris.

De manière surprenante, le facteur de transcription CREB est activé dans les différents cas, que ce soit lors d'événements transcriptionnels ou post-transcriptionnels. Le promoteur du gène SMN2 abrite des éléments CRE, sites où se fixe CREB, considérés comme essentiels pour la transactivation du gène SMN (Majumder et coll., *J Biol Chem*, 2004). Ainsi nous avons constaté que lorsque CREB est phosphorylé dans la moelle épinière des souris mimant la SMA, la liaison de CREB à ses éléments de réponse est significativement augmentée et corrélée avec une augmentation de l'acétylation des histones (Données complémentaires de l'article 1 ; article 2 fig. 2 et 3 et article 3 fig. 3). Par ailleurs, les analyses cinétiques ont révélé que l'inhibition de ERK entraîne une activation de CREB dans l'heure (Article 2 fig. 4) et une augmentation de la transcription des transgènes SMN2 dans les 2 heures suivant l'inhibition (Article 2 fig. 1).

Si la voie AKT/CREB est largement considérée comme bénéfique pour les neurones, notamment dans des contextes neurodégénératifs (van der Heide et coll., *Prog Neurobiol*, 2006; Lunn et coll., *Dev Neurobiol*, 2009; Jimenez et coll., *J Biol Chem*, 2011), le rôle de la voie ERK/Elk-1 dans les neurones est plus nuancé et semble varier selon le modèle de lésion neuronale (Maiese et coll., *J Neurosci Res*, 1993; Ueda et coll., *J Biol Chem*, 1996; Meyer-Franke et coll., *Neuron*, 1998; Cha et coll., *J Neurochem*, 2000; Colucci-D'Amato et coll., *Bioessays*, 2003; Cheung et coll., *Biochem Biophys Res Commun*, 2004; Yu et Yezierski, *Brain Res Mol Brain Res*, 2005; Lu et coll., *J Surg Oncol*, 2010). De plus, peu d'études portent sur le rôle de la voie ERK dans les motoneurones dans des contextes normaux ou pathologiques (Hollis et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009). Nous avons constaté que la voie ERK/Elk-1 est constitutivement activée dans la moelle épinière des

souris mimant la SMA (Article 1 fig. 7 et compléments ; article 2 fig. 2 et article 3 fig. 1, 2 et 4). Nos données suggèrent que, dans le contexte spécifique de la SMA, cette voie exerce un rôle répressif sur la transcription du gène *SMN2* et participerait probablement à la pathogenèse de la maladie. Bien que Elk-1 soit généralement connu comme un facteur de transactivation, notamment via le complexe SRF (Gille et coll., *Curr Biol*, 1995), un rôle répressif de Elk-1 a déjà été signalé, dans certaines circonstances (Besnard et coll., *Front Neurosci*, 2011). Dans la moelle épinière des souris mimant la SMA la fixation de Elk-1 sur le promoteur du gène *SMN2* est corrélée avec la déacétylation des histones H3 et H4 (Données complémentaires de l'article 1 ; article 2 fig. 2 et 3 et article 3 fig. 3). En outre, le rôle répressif de Elk-1 dans l'expression du gène *SMN* s'est avéré être spécifique des tissus SMA. En effet, la privation de Elk-1 dans des cultures cellulaires neuronales entraîne une diminution significative de l'expression du gène *SMN* (Demir et coll., *Biochim Biophys Acta*, 2011). De plus, nous avons constaté qu'une inhibition de ERK (contrairement à l'activation des NMDARs) dans la moelle épinière des souris contrôles augmentait légèrement, mais significativement, la phosphorylation de Elk-1 sans pour autant diminuer la production de *SMN* (Article 2 fig. 1 et 2). Cette divergence de réponse peut résulter des modifications des voies de signalisation dans les tissus SMA par rapport aux tissus contrôles (Millino et coll., *BMC Med*, 2009), parmi lesquelles, certaines pourraient converger vers Elk-1 ou CREB.

Au final, l'inhibition de la phosphorylation et de la fixation de Elk-1 entraîne une augmentation significative de la fixation de CREB puis de l'acétylation des histones H3 et H4 du promoteur du gène *SMN2*. Ces événements moléculaires au niveau du promoteur sont corrélés avec une augmentation significative de l'expression la protéine *SMN*, qui est susceptible de résulter de l'activation transcriptionnelle du gène *SMN2*. Toutes ces données suggèrent que Elk-1 et CREB sont en compétition pour les mêmes sites, conduisant au recrutement d'un complexe de répression soit d'un complexe activant la transcription. En revanche, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que l'augmentation de la protéine *SMN* lors de nos différents traitements soit également liée à une augmentation de la stabilité des transcrits ou de la protéine *SMN*. Ainsi, il a été montré que l'activation de P38, une autre kinase de la famille MAP, stabilisait efficacement les transcrits *SMN* grâce à la protéine de liaison HuR (Farooq et coll., *Hum Mol Genet*, 2009).

VI. Les voies PI3K/AKT/CREB et MEK/ERK/Elk-1 sont en balance dans la moelle épinière et les muscles SMA. Le blocage spécifique d'un membre d'une des deux voies entraîne l'activation de l'autre voie et vice versa.

Les voies de signalisation AKT et ERK sont connues pour être régulièrement activées simultanément en réponse aux facteurs et hormones de croissance (Katz et McCormick, *Curr Opin Genet Dev*, 1997; Rodriguez-Viciana et coll., *Cell*, 1997). De même, celles-ci sont souvent synergiques afin de produire un signal plus important (Rommel et coll., *Science*, 1999; von Gise et coll., *Mol Cell Biol*, 2001). Cependant, dans certain cas l'activation de la voie AKT induit l'inhibition de la voie ERK, comme pour le contrôle de la survie des neurones (Subramaniam et coll., *J Neurosci*, 2005) ou la différenciation musculaire (Rommel et coll., *Science*, 1999). L'ensemble de nos données suggère qu'il existe un équilibre dynamique entre les voies MEK/ERK/Elk-1 et PI3K/AKT/CREB dans les cellules musculaires et de la moelle épinière dans un contexte de SMA. L'inhibition d'une voie induit l'activation de l'autre et vice versa. Nous avons démontré que l'inhibition de ERK activait de manière séquentielle AKT et CREB (Article 2 fig. 2, 4 et 8). A l'inverse, dans un contexte où la voie

PI3K/AKT/CREB est activée par le NMDA, l'inhibition de CREB induit l'inhibition d'AKT en amont et la réactivation de la voie MEK/ERK/Elk-1 (Article 2 fig. 6).

La cinétique du passage d'activation entre ERK et AKT exclut une étape de transcription (Article 2 fig. 4). Ainsi, les molécules responsables de l'interconnexion doivent se trouver en amont des voies de signalisation ERK et AKT, telle que la kinase CaMKII. Les CaMKs appartiennent à la famille des kinases impliquées dans le décodage du signal calcique. Elles sont capables de transmettre le signal provenant de la surface vers le noyau, en fonction du type cellulaire, par l'intermédiaire d'autres kinases, telles que ERK ou AKT, ou des facteurs de transcription, tels que CREB ou Elk-1 (Johnson et coll., *J Neurosci*, 1997; Lee et coll., *Neuroscience*, 2004). L'inhibition de CaMKII par du KN-93 empêche la réactivation de la voie PI3K/AKT/CREB et l'expression de SMN (Article 1 fig. 6 et 8. et article 2 fig. 5). Cette molécule clef pourrait permettre le passage entre les deux voies PI3K/AKT/CREB et MEK/ERK/Elk-1.

Le mécanisme précis du passage d'activation entre ERK et AKT lors de la diminution de l'expression d'IGF-1R demeure encore inconnu. Dans ce cas, précis nous avons constaté que CaMKII n'était pas phosphorylée dans la moelle épinière des souris mimant la SMA *IGF-1R^{+/+}* et *IGF-1R^{-/-}* (Données complémentaires de l'article 3). Par conséquent la réactivation de la voie PI3K/AKT/CREB est indépendante du flux calcique. Il est probable que le passage d'activation entre les voies ERK et AKT soit lié aux premiers intermédiaires de la voie de signalisation : IRS1/2 qui déclenche la voie AKT et p66SHC qui déclenche la voie ERK (Butler et coll., *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1998). IRS semble avoir une forte affinité pour l'IGF-1R phosphorylé (Huang et coll., *FEBS Lett*, 2001) et l'IGF-1R stimulé met moins de temps à phosphoryler IRS1/2 que SHC (Sasaoka et coll., *J Biol Chem*, 1996). Ces résultats nous conduisent à supposer que IRS1/2 peut se lier à l'IGF-1R, même lorsque celui-ci est faiblement exprimé, puis IRS1/2 active AKT par PI3K, ce qui pourrait par la suite déclencher l'activation de CREB (Tseng et coll., *J Biol Chem*, 2002). A l'inverse, comme l'affinité de SHC pour l'IGF-1R est plus faible, son activation pourrait nécessiter une forte expression du récepteur à la surface cellulaire. Ainsi, SHC activerait ERK par la cascade RAF/RAS et serait susceptible d'inhiber la phosphorylation de AKT comme nous l'avons montré dans les muscles et la moelle épinière (Article 2).

VII. L'induction d'un flux calcique et la phosphorylation de CaMKII réactivent la voie PI3K/AKT/CREB au détriment de la voie MEK/ERK/Elk-1.

Les NMDARs, lors de l'activité synaptique, régulent une part de l'entrée de calcium dans la cellule et déclenchent, par la même occasion, une part des voies de signalisation dépendantes du calcium telles que MAP kinases, CaMKII et PI3K (Gardoni et coll., *J Neurosci*, 2001; Sutton et Chandler, *J Neurochem*, 2002; Krapivinsky et coll., *Neuron*, 2003; Thalhammer et coll., *EMBO J*, 2006). Ainsi différentes études ont indiqué que ERK, JNK et p38 (différents membres de la famille des MAP kinases) étaient transitoirement activées suite à l'influx de Calcium traversant les NMDARs stimulés dans des cultures de cellules corticales ou de l'hippocampe. En outre, il a été déterminé que l'âge de la culture, le niveau d'activation et la composition en sous-unités des NMDARs influençaient l'amplitude de la phosphorylation des MAP kinases (Ko et coll., *J Neurochem*, 1998; Crossthwaite et coll., *J Neurochem*, 2004; Waxman et Lynch, *J Biol Chem*, 2005).

Dans le contexte particulier de la SMA, Il s'avère que l'influx de calcium à travers les NMDARs régule l'activation de CaMKII, qui est indispensable, pour l'expression de la protéine SMN (Article 1 Fig. 6). En effet, l'inhibition de CaMKII, par du KN-93, empêche l'expression de la protéine SMN (Article 1 Fig. 6). De même, une forte dose de NMDA diminue fortement la phosphorylation de CaMKII et diminue l'expression de la protéine SMN chez les souris mimant la SMA et contrôles (Article 1 fig. sup. 3). Ce constat rejoint les résultats observés dans des cultures de cellules d'hippocampe de rat où un traitement avec des doses toxiques de NMDA induisait une réduction de l'activation de CaMKII (Morioka et coll., *J Neurochem*, 1995).

L'inhibition de ERK entraîne, elle aussi, rapidement un afflux de calcium dans le cytoplasme des motoneurones (Article 2 fig. 5). Nous avons constaté que ce phénomène était plus important dans les motoneurones des souris mimant la SMA que dans les motoneurones de souris contrôles. En effet, la fréquence des flux transitoires de Ca^{2+} est réduite dans les cultures de motoneurones déficient en SMN (Jablonka et coll., *J Cell Biol*, 2007) et le U0126 induit un afflux identique dans les motoneurones, indépendamment du génotype. Ainsi, l'augmentation est plus importante dans les motoneurones issus de souris mimant la SMA. Cette dernière donnée renforce l'hypothèse selon laquelle des canaux calciques seraient bloqués dans les moelles épinières SMA.

En outre, la chélation du calcium abolit l'activation de la voie CaMKII/AKT/CREB (Article 1 fig. 8 et article 2 fig. 5) ou l'augmentation de SMN (Article 1 fig. 6 et article 2 fig. 5), ce qui atteste de son rôle crucial dans la pathologie. Les données actuelles nous conduisent à penser que, dans le contexte spécifique de SMA, la sur-activation constitutive de la voie ERK pourrait participer à l'altération homéostasie calcique, comme démontré dans la terminaison nerveuse d'un autre modèle de souris mimant la SMA sévère (Ruiz et coll., *J Neurosci*, 2010).

Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent que, dans la moelle épinière, le signal calcique est décodé par CaMKII qui active AKT qui active, lui-même, CREB. La diminution du flux calcique empêche l'activation de CREB et, à terme, induit la diminution de l'expression du gène *SMN2*.

VIII. La voie JAK/STAT3/SOCS, indépendante du calcium, régulerait également la balance entre les voies MEK/ERK/Elk-1 et PI3K/AKT/CREB.

Les gènes SOCS-1 et 3 sont des cibles directes de STAT3 dans le système nerveux central (Yadav et coll., *J Biol Chem*, 2005). Il a été démontré que les protéines SOCS pouvaient interagir avec l'IGF-1R et moduler sa signalisation. En effet, SOCS-1 et 3 sont capables de diminuer l'activation de la voie AKT en adressant IRS1/2 au protéasome (Dey et coll., *J Biol Chem*, 1998; Dey et coll., *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; Inaba et coll., *Biochem Biophys Res Commun*, 2005). En outre, il a été démontré dans des cultures de cellules musculaires que la surexpression de SOCS-1 stimulait la phosphorylation de MEK et diminuait la phosphorylation de AKT induite par l'IGF-1 (Inaba et coll., *Biochem Biophys Res Commun*, 2005). A ce jour, aucun rôle n'a été signalé pour la voie JAK/STAT3/SOCS dans la pathogenèse de la SMA. Nous avons constaté que cette voie était surexprimée, tout comme la voie ERK, dans la moelle épinière et les muscles de souris mimant la SMA (Article 3 fig. 1, 2 et 8). En revanche, la phosphorylation de STAT3 et l'expression de SOCS1 et 3 diminuent

suite à un exercice physique ou lors de l'invalidation partielle d'*IGF-1R*, tous deux étant bénéfiques pour les souris mimant la SMA ([Article 3 fig. 1 et 2](#)). Dans un contexte de SMA, la voie JAK/STAT3/SOCS pourrait participer à la diminution de l'activation de la voie PI3K/AKT/CREB. L'ensemble de ces données suggère un rôle néfaste de l'activation de cette voie dans la moelle épinière et les muscles de SMA.

IX. L'inhibition de la voie MEK/ERK/Elk-1 par l'AZD6244, un médicament actuellement employé dans des essais cliniques, est bénéfique pour les souris mimant la SMA de type I.

Inutile de dire que la transposition de nos résultats sur le traitement au NMDA chez des patients humains nécessite de très nombreuses étapes préliminaires, telles la détermination du seuil nociceptif et de la dose efficace de NMDA ou autre agoniste des NMDARs. En revanche, le Selumetinib, un inhibiteur de ERK développé par Selleck medical, est déjà utilisé lors d'essais cliniques pour le traitement des cancers spécifiques et déclenche peu d'effets secondaires ([Board et coll., Br J Cancer, 2009](#)). Le Selumetinib pourrait être une des prochaines molécules candidates à tester chez les patients atteints de SMA de type I.

PERSPECTIVES

La perspective majeure de ce travail de thèse est l'analyse des bases moléculaires du contrôle de l'expression transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des gènes *SMN2*, dans le cadre d'une activation des NMDARs dans des souris mimant la SMA de type II. Cette analyse pourrait se faire par 1) l'analyse des molécules connues pour moduler l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2*, chez les souris mimant la SMA de type II et 2) la comparaison des transcriptomes des moelles épinières de souris contrôles et mimant la SMA de type II entraînées ou traitées au NMDA ou *IGF-1R^{+/-}* aux deux âges charnières de la régulation de SMN : P6 et P12. Outre l'intérêt fondamental de décrypter le lien entre l'activité des motoneurons et la régulation du gène *SMN* dans ces cellules, les perspectives de cette étude visent à identifier de nouvelles molécules susceptibles d'atténuer les symptômes de la SMA.

I Analyse de l'effet d'un traitement au NMDA dans le contrôle transcriptionnel ou post-transcriptionnel de l'expression du gène *SMN2*.

Un des buts majeurs des thérapies contre la SMA est d'augmenter les niveaux de protéines SMN dans les différents tissus des patients malades. Ceci peut être réalisé via l'augmentation de l'expression des gènes *SMN2* présents chez les patients. Nous avons démontré que l'activité synaptique, en particulier la stimulation des NMDARs, était capable d'augmenter significativement le niveau de protéine SMN. Ainsi, dans la moelle épinière de souris mimant la SMA de type I et de type II à P6, cette stimulation déclenche une augmentation de la transcription du gène *SMN2* (Article 1 fig. 5 et complément) et dans la moelle épinière de souris mimant la SMA de type II à P12, cette stimulation favorise l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits générés par *SMN2* (Article 1 fig. 5). Nous avons démontré que l'inhibition de ERK dans la moelle épinière de souris mimant la SMA de type I à P6, était capable de reproduire les effets du traitement au NMDA sur l'expression de SMN (Article 2 fig. 1). Par ailleurs, les mécanismes contrôlant l'épissage des transcrits SMN après une stimulation des NMDARs sont inconnus. Ceux-ci pourraient être activés pharmacologiquement et être utilisés avec des inhibiteurs de ERK afin d'augmenter la transcription de *SMN2* et l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN.

Le traitement au NMDA favorise l'activation du facteur de transcription CREB et inhibe le facteur de transcription Elk-1 (Article 1 et complément). L'impact de chacune de ces voies sur l'expression de SMN est à préciser. Quel est l'impact de la bascule entre les voies MEK/ERK/Elk-1 et PI3K/AKT/CREB sur la stabilité des transcrits SMN ? Quels sont les rôles des facteurs de transcriptions CREB et Elk-1 dans l'épissage des gènes SMN ?

Premièrement, puisque les transcrits SMN sont soumis à une régulation importante de leur stabilité (Heier et coll., *J Child Neurol*, 2007), nous pourrions rechercher si l'augmentation des transcrits SMN induite par le NMDA est liée à une augmentation de la durée de vie des ARNm. Pour ce faire, nous pourrions utiliser notre système de co-culture d'explants de moelle épinière d'embryon à E11,5 contrôles ou mimant la SMA sur une monocouche de cellules musculaires (Articles 1 et 2). Les explants de moelle épinière seraient traités avec du NMDA en présence ou en absence d'inhibiteurs de la transcription, comme l'actinomycine D ou le 1-β-d-ribobenzimidazole ; puis les ARN totaux seraient récoltés à différents temps en vue de réaliser une RT-PCR quantitative. Dans le cas, où le

traitement au NMDA induirait une augmentation de la stabilité des transcrits SMN, nous analyserions le niveau d'activation de p38. Ce membre de la famille des MAP kinases est connu pour moduler la demi-vie des transcrits SMN (Farooq et coll., *Hum Mol Genet*, 2009). Le profil de phosphorylation de p38 serait étudié *in vivo* dans les moelles épinières de souris contrôles ou mimant la SMA traitées avec du NMDA ou un placebo. Par la suite, s'il s'avère que p38 est activée par le NMDA, nous pourrions analyser le profil d'activation de HuR, une cible de p38 impliquée dans la stabilité des ARNm SMN. Il a été démontré que HuR passait du noyau au cytoplasme lors de traitement qui stabilisait les transcrits SMN (Farooq et coll., *Hum Mol Genet*, 2009). De ce fait, nous analyserions par immunocytochimie la localisation de HuR dans les motoneurones en présence de NMDA. En outre, le rôle de p38 serait vérifié dans des co-cultures traitées ou non avec du NMDA et du SB239580, un inhibiteur de p38. Si la voie p38/HuR s'avère activée lors du traitement au NMDA, nous étendrons cette étude aux souris traitées aux inhibiteurs de ERK ou invalidées partiellement pour *IGF-1R*.

Plusieurs études ont décrit une régulation directe des profils d'épissage de pré-ARN messagers par les voies PI3K/AKT ou MEK/ERK (Konig et coll., *EMBO J*, 1998; van der Houven van Oordt et coll., *J Cell Biol*, 2000; Xie et Black, *Nature*, 2001; Matter et coll., *Nature*, 2002). Dans chacun de ces cas, les kinases procèdent à la phosphorylation de composants clef du spliceosome. Nous pourrions évaluer le rôle de ERK et AKT, dans la modulation de l'épissage induite par le traitement au NMDA, grâce à des séries d'inhibitions spécifiques *in vivo*. Un traitement combiné de NMDA (100 μ M) et de U0126 (10 μ M, inhibiteur de ERK) ou de LY294002 (100 μ M, inhibiteur de PI3K/AKT) administré directement en intrathécal entre P8 et P12, nous renseignerait sur l'implication de chaque kinase dans les événements transcriptionnels ou post-transcriptionnels. Les transcrits ainsi générés par *SMN2* seraient comparés par RT-PCR quantitative aux transcrits présents dans des souris contrôles et mimant la SMA seulement traitées au NMDA.

Deuxièmement, il serait intéressant de décrypter les rôles de CREB et de Elk-1 dans la modulation de la transcription et l'épissage de *SMN*. En effet, il a été démontré que la fixation de complexes protéiques sur le promoteur et les co-activateurs transcriptionnels pouvaient influencer, tous deux, l'épissage des pré-ARN messagers. (Basu et coll., *Mol Cell Biol*, 1997; Cramer et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; Monsalve et coll., *Mol Cell*, 2000; Auboeuf et coll., *Science*, 2002; Auboeuf et coll., *Mol Cell Biol*, 2005; Dowhan et coll., *Mol Cell*, 2005; Fox et Kandpal, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006).

CREB semble être la protéine clef de la modulation de la transcription et de l'épissage du gène *SMN2* dans les moelles épinières de souris mimant la SMA. En premier lieu, CREB est activé par le traitement au NMDA dans les souris contrôles et mimant la SMA à P6 et P12 (Article 1 fig. 8). En second lieu, lorsque CREB est activé par le NMDA ou l'inhibition de ERK à P6, celui-ci se fixe sur le promoteur du gène *SMN2*. La liaison de CREB est corrélée à une hausse de l'acétylation des histones H3 et H4, suggérant une transactivation du gène *SMN2* (Complément de l'article 1 et article 2 fig. 2 et 3). Enfin, les CRTCs (CREB Regulated Transcription Co-activator) sont des composants de la voie de signalisation CREB qui sont capables de réguler l'expression de gène contenant des motifs CRE et/ou contrôler l'épissage de pré-ARN messagers. En outre, contrairement aux autres co-activateurs qui contiennent des motifs de liaison à l'ARN, les CRTCs peuvent induire un phénomène d'épissage alternatif sans augmenter la transcription et, à l'inverse, activer directement la transcription sans altérer l'épissage (Amelio et coll., *EMBO J*, 2009).

Nous pourrions analyser l'absolue nécessité du recrutement de CREB dans l'expression de SMN suite à une activation des NMDARs. Pour ce faire nous utiliserions des approches *in vivo* à P6 et P12. Un traitement combiné de NMDA (100 μ M) et KG501, un inhibiteur de CREB (10 μ M) pourrait être injecté directement en intrathécal dans des souris contrôles et mimant la SMA de la naissance à P6 ou de P8 à P12. L'effet de ce traitement sur l'expression des transgènes *SMN2* serait analysé par RT-PCR quantitative (niveau de transcription et l'épissage des ARN) et par western immunoblot (niveau de protéine). Les résultats seraient comparés à ceux obtenus chez les souris traitées avec du NMDA seul ou un placebo. De même, le rôle de Elk-1 pourrait être évalué de la même manière soit en inhibant indirectement Elk-1 via l'inhibition de ERK, soit en inhibant Elk-1 directement avec l'inhibiteur développé par le groupe de J. Caboche (Université Paris VI, France).

S'il s'avère que CREB est essentiel pour l'activation de l'expression de SMN, suite à une activation des NMDARs, nous pourrions analyser les niveaux d'expression des CRTCs. Nous pourrions suivre leur localisation subcellulaire, leur niveau d'expression et leur état de phosphorylation en combinant des analyses immunohistochimiques, des RT-PCR quantitatives et des westerns immunoblots. Il a été décrit que durant des conditions basales, les CRTCs sont inhibés par phosphorylation par les kinases AMP/SNF et sont liées au protéines 14-3-3 qui les maintiennent dans le cytoplasme (Screaton et coll., *Cell*, 2004; Koo et coll., *Nature*, 2005; Jansson et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008). En revanche, lors d'une entrée calcique, PKA lève leur inhibition et les CRTCs déphosphorylés sont libérés et entrent dans le noyau afin de se lier à CREB (Bittinger et coll., *Curr Biol*, 2004; Screaton et coll., *Cell*, 2004). Si un des membres de la famille des CRTCs semble impliqué dans l'expression de *SMN2* induite par le NMDA dans la moelle épinière. Nous pourrions tester sa surexpression dans des cultures primaires de motoneurons ou de cellules musculaires provenant de patients atteints de SMA.

II Analyse des molécules impliquées dans l'épissage qui pourraient conduire à l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits provenant du gène *SMN2* dans un contexte de SMA

Nous avons constaté que dans les souris mimant la SMA de type II, le traitement au NMDA entre P8 et P12 favorisait l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2* (Article 1 fig. 5). Les mécanismes impliqués dans ce processus pourraient être analysés en deux étapes successives.

Premièrement nous pourrions réaliser une analyse des profils d'activation des protéines connues responsables de l'épissage alternatif de SMN, tel que les protéines SR, SR-like et hnRNP A1/A2 (Cartegni et coll., *Am J Hum Genet*, 2006). En outre, ces protéines régulatrices sont des cibles des cascades moléculaires affectées par l'activation des NMDARs (Blaustein et coll., *Int J Biochem Cell Biol*, 2007). Nous pourrions nous focaliser sur la protéine SR SF2/ASF, qui est considérée comme le déterminant indispensable de l'inclusion de l'exon7 (Cartegni et coll., *Am J Hum Genet*, 2006) ou la protéine SR-like hTra2- β 1 qui augmente l'inclusion de l'exon 7 de manière dose-dépendante (Hofmann et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000). De même, nous pourrions examiner le profil de hnRNP A1, qui déclenche l'excision de l'exon 7 (Kashima et Manley, *Nat Genet*, 2003). Les niveaux de phosphorylation dans la moelle épinière de souris mimant la SMA traitées avec un placebo ou du NMDA seraient analysés par western immunoblots. De plus, les changements de

localisation subcellulaire dans les motoneurones pourraient être analysés par immunocytochimie.

Deuxièmement, si une des protéines mentionnées ci-dessus est impliquée dans l'inclusion de l'exon 7 suite à l'activation des NMDARs, nous pourrions rechercher les mécanismes reliant les deux événements. Dans ce contexte, nous nous concentrerions sur AKT, qui est capable de phosphoryler les protéines SR et SR-like (Blaustein et coll., *Int J Biochem Cell Biol*, 2007) et p38 qui favorise l'accumulation de hnRNP A1 dans le cytoplasme (van der Houven van Oordt et coll., *J Cell Biol*, 2000). Pour ce faire, nous pourrions réaliser des injections intrathécales de LY294002, inhibiteur de PI3K/AKT ou SB239580, inhibiteur de p38 avec ou sans NMDA. Nous regarderions ensuite l'effet de l'inhibition de ces kinases sur l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN2 et les profils d'activation des protéines régulatrices de l'épissage identifiées.

III Analyse des gènes dont l'expression est modulée dans les moelles épinières SMA par l'exercice, une stimulation des NMDARs ou l'inactivation partielle d'IGF-1R à P6 et P12.

Le fait que différents protocoles donnent des résultats comparables en termes d'épissage ou de transcription du gène *SMN* ouvre des perspectives uniques pour identifier les mécanismes impliqués dans ces deux événements. Nous envisageons de comparer le transcriptôme de la moelle lombaire à P6 et P12 en fonction des différents traitements. Ces données pourraient nous permettre d'identifier les mécanismes impliqués dans une modulation de la transcription à P6 et une inclusion de l'exon 7 à P12. Une approche transcriptomique serait initiée sur des souris contrôles ou mimant la SMA entraînées, traitées au NMDARs ou invalidées partiellement pour d'IGF-1R. Les gènes qui montrent des modulations comparables dans les trois traitements sont de sérieux candidats pour une initiation de la régulation de l'épissage du gène *SMN*.

IV Autres perspectives

Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique de la voie ERK constitue un moyen de stimuler l'expression de *SMN* dans la moelle épinière des souris mimant la SMA de type I, durant la phase symptomatique de la maladie. Il serait intéressant d'analyser les effets de cette même inhibition dans des modèles murins de SMA moins sévère. Les différents inhibiteurs de ERK peuvent-ils mimer les effets du NMDA ? Si oui dans quelle mesure ? Nous pourrions regarder si les inhibiteurs de ERK sont toujours capables d'induire une neuroprotection à P12 et s'ils peuvent accélérer la maturation de l'unité motrice. Par ailleurs, il faudrait comparer la portée des effets du U0126, administré en intrathécal avec les effets du Sélumétinib, administré par voie orale. En outre, il serait intéressant de regarder si l'inhibition de ERK agit encore sur la transcription du gène *SMN2* à P12 ou module l'épissage de ses transcrits, comme le NMDA et l'exercice physique.

De plus, il serait intéressant d'évaluer les effets de nos traitements sur l'ensemble de la moelle épinière, notamment au niveau thoracique où les motoneurones innervent les muscles respiratoires. Pour ce faire, il faudrait réaliser un co-marquage avec des anticorps anti-SMN et anti-ChAT. Nous pourrions, ainsi, avoir un aperçu du nombre et de la surface

des motoneurones dans cette région de la moelle épinière, l'étendu de la neuroprotection de nos traitement et le nombre de gems par motoneurones.

Enfin, nous avons démontré qu'une diminution de moitié de la concentration des IGF-1R, était largement bénéfique dans le cadre de la SMA. Nous pourrions essayer de recréer ces effets en utilisant des inhibiteurs d'IGF-1R déjà utilisés lors de tests cliniques ([Weroha et Haluska, J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2008](#)). Il faudrait sélectionner un ou deux inhibiteurs qui ne présentent peu ou pas d'effets secondaires puis déterminer le mode d'administration et la dose efficace chez les souris contrôles et mimant la SMA de type II. Nous évaluerions dans un premier temps la durée de vie, le poids et les capacités motrices des souris traitées. Dans un second temps, nous nous focaliserions sur l'impact du traitement sur l'unité motrice dans son ensemble. Enfin, dans un dernier temps, si l'inhibition pharmacologique d'IGF1-R s'avère bénéfique, nous pourrions décrypter les mécanismes en jeu dans le traitement et le tester sur des cultures de myoblastes ou cellules nerveuses issues de patients atteints de SMA.

BIBLIOGRAPHIE

- Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW (2005) Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:4217-4221.
- Aerbajinai W, Ishihara T, Arahata K, Tsukahara T (2002) Increased expression level of the splicing variant of SIP1 in motor neuron diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 34:699-707.
- Akutsu T, Nishio H, Sumino K, Takeshima Y, Tsuneishi S, Wada H, Takada S, Matsuo M, Nakamura H (2002) Molecular genetics of spinal muscular atrophy: contribution of the NAIP gene to clinical severity. *Kobe J Med Sci* 48:25-31.
- Al-Rajeh S, Bademosi O, Gascon GG, Stumpf D (1992) Werdnig Hoffman's disease (spinal muscular atrophy type I): A clinical study of 25 Saudi nationals in Al-Khobar. *Ann Saudi Med* 12:67-71.
- Alderson RF, Alterman AL, Barde YA, Lindsay RM (1990) Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron* 5:297-306.
- Allfrey VG (1966) Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc Can Cancer Conf* 6:313-335.
- Amelio AL, Caputi M, Conkright MD (2009) Bipartite functions of the CREB co-activators selectively direct alternative splicing or transcriptional activation. *EMBO J* 28:2733-2747.
- Andersson O, Stenqvist A, Attersand A, von Euler G (2001) Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosomal localization of genes encoding the human NMDA receptor subunits NR3A and NR3B. *Genomics* 78:178-184.
- Andrade LE, Tan EM, Chan EK (1993) Immunocytochemical analysis of the coiled body in the cell cycle and during cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1947-1951.
- Andreassi C, Patrizi AL, Monani UR, Burghes AH, Brahe C, Eboli ML (2002) Expression of the survival of motor neuron (SMN) gene in primary neurons and increase in SMN levels by activation of the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor. *Neurogenetics* 4:29-36.
- Andreassi C, Jarecki J, Zhou J, Coovert DD, Monani UR, Chen X, Whitney M, Pollok B, Zhang M, Androphy E, Burghes AH (2001) Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients. *Hum Mol Genet* 10:2841-2849.
- Andreassi C, Angelozzi C, Tiziano FD, Vitali T, De Vincenzi E, Boninsegna A, Villanova M, Bertini E, Pini A, Neri G, Brahe C (2004) Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 12:59-65.
- Anhuf D, Eggermann T, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K (2003) Determination of SMN1 and SMN2 copy number using TaqMan technology. *Hum Mutat* 22:74-78.
- Antony C, Huchet M, Changeux JP, Cartaud J (1995) Developmental regulation of membrane traffic organization during synaptogenesis in mouse diaphragm muscle. *J Cell Biol* 130:959-968.
- Arai H, Tanabe Y, Hachiya Y, Otsuka E, Kumada S, Furushima W, Kohyama J, Yamashita S, Takanashi J, Kohno Y (2005) Finger cold-induced vasodilatation, sympathetic skin response, and R-R interval variation in patients with progressive spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 20:871-875.
- Araujo Ade Q, Araujo M, Swoboda KJ (2009) Vascular perfusion abnormalities in infants with spinal muscular atrophy. *J Pediatr* 155:292-294.
- Arkin SM (1999) Elder rehab: a student-supervised exercise program for Alzheimer's patients. *Gerontologist* 39:729-735.
- Arnold AS, Egger A, Handschin C (2011) PGC-1alpha and myokines in the aging muscle - a mini-review. *Gerontology* 57:37-43.
- Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O (2001) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci* 14:10-18.
- Auboeuf D, Honig A, Berget SM, O'Malley BW (2002) Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science* 298:416-419.
- Auboeuf D, Dowhan DH, Dutertre M, Martin N, Berget SM, O'Malley BW (2005) A subset of nuclear receptor coregulators act as coupling proteins during synthesis and maturation of RNA transcripts. *Mol Cell Biol* 25:5307-5316.
- Avila AM, Burnett BG, Taye AA, Gabanella F, Knight MA, Hartenstein P, Cizman Z, Di Prospero NA, Pellizzoni L, Fischbeck KH, Sumner CJ (2007) Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 117:659-671.
- Azzouz M, Le T, Ralph GS, Walmsley L, Monani UR, Lee DC, Wilkes F, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Burghes AH, Mazarakis ND (2004) Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 114:1726-1731.
- Baccon J, Pellizzoni L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2002) Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex. *J Biol Chem* 277:31957-31962.
- Bach JR (2007) Medical considerations of long-term survival of Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Phys Med Rehabil* 86:349-355.
- Bach JR, Baird JS, Plosky D, Navado J, Weaver B (2002) Spinal muscular atrophy type 1: management and outcomes. *Pediatr Pulmonol* 34:16-22.
- Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75:73-82.
- Balazs R, Hack N, Jorgensen OS, Cotman CW (1989) N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells: pharmacological characterization. *Neurosci Lett* 101:241-246.
- Balice-Gordon RJ, Chua CK, Nelson CC, Lichtman JW (1993) Gradual loss of synaptic cartels precedes axon withdrawal at developing neuromuscular junctions. *Neuron* 11:801-815.
- Barbeau H, Rossignol S (1987) Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Res* 412:84-95.
- Baron-Delage S, Abadie A, Echaniz-Laguna A, Melki J, Beretta L (2000) Interferons and IRF-1 induce expression of the survival motor neuron (SMN) genes. *Mol Med* 6:957-968.
- Barton-Davis ER, Shoturma DI, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL (1998) Viral mediated expression of insulin-like

- growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15603-15607.
- Basu A, Dong B, Krainer AR, Howe CC (1997) The intracisternal A-particle proximal enhancer-binding protein activates transcription and is identical to the RNA- and DNA-binding protein p54nrb/NonO. *Mol Cell Biol* 17:677-686.
- Battaglia G, Princivalle A, Forti F, Lizier C, Zeviani M (1997) Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system. *Hum Mol Genet* 6:1961-1971.
- Bebee TW, Gladman JT, Chandler DS (2010) Splicing regulation of the survival motor neuron genes and implications for treatment of spinal muscular atrophy. *Front Biosci* 15:1191-1204.
- Bechade C, Rostaing P, Cisterni C, Kalisch R, La Bella V, Pettmann B, Triller A (1999) Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein: possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport. *Eur J Neurosci* 11:293-304.
- Beevor C (1902) A case of congenital spinal muscular atrophy (family type) and a case of hemorrhage into the spinal cord at birth giving similar symptoms. *Brain* 25:85-108.
- Bennet A (1883) On chronic atrophic spinal paralysis in children. *Brain* 6:289-301.
- Benony C, Golse B, Larome A, Benony H (2004) Amyotrophie spinale infantile de type II et compétences langagières. *Ann Med Psychol* 162:134-139.
- Bernard C (1858) Leçons sur la physiologie et la pathologie du système nerveux. *JB Baillière et fils*.
- Besnard A, Galan-Rodriguez B, Vanhoutte P, Caboche J (2011) Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. *Front Neurosci* 5:35.
- Bevan AK, Hutchinson KR, Foust KD, Braun L, McGovern VL, Schmelzer L, Ward JG, Petruska JC, Lucchesi PA, Burghes AH, Kaspar BK (2010) Early heart failure in the SMNDelta7 model of spinal muscular atrophy and correction by postnatal scAAV9-SMN delivery. *Hum Mol Genet* 19:3895-3905.
- Bevan S, Steinbach JH (1977) The distribution of alpha-bungarotoxin binding sites of mammalian skeletal muscle developing in vivo. *J Physiol* 267:195-213.
- Bilic E, Rudan I, Kusec V, Zurak N, Delimar D, Zagar M (2006) Comparison of the growth hormone, IGF-1 and insulin in cerebrospinal fluid and serum between patients with motor neuron disease and healthy controls. *Eur J Neurol* 13:1340-1345.
- Biondi O, Grondard C, Lecolle S, Deforges S, Pariset C, Lopes P, Cifuentes-Diaz C, Li H, della Gaspera B, Chanoine C, Charbonnier F (2008) Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* 28:953-962.
- Biros I, Forrest S (1999) Spinal muscular atrophy: untangling the knot? *J Med Genet* 36:1-8.
- Bittinger MA, McWhinnie E, Meltzer J, Iourgenko V, Latario B, Liu X, Chen CH, Song C, Garza D, Labow M (2004) Activation of cAMP response element-mediated gene expression by regulated nuclear transport of TORC proteins. *Curr Biol* 14:2156-2161.
- Blaustein M, Pelisch F, Srebrow A (2007) Signals, pathways and splicing regulation. *Int J Biochem Cell Biol* 39:2031-2048.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bloch RJ, Bezakova G, Ursitti JA, Zhou D, Pumplin DW (1997) A membrane skeleton that clusters nicotinic acetylcholine receptors in muscle. *Soc Gen Physiol Ser* 52:177-195.
- Board RE, Ellison G, Orr MC, Kemsley KR, McWalter G, Blockley LY, Dearden SP, Morris C, Ranson M, Cantarini MV, Dive C, Hughes A (2009) Detection of BRAF mutations in the tumour and serum of patients enrolled in the AZD6244 (ARRY-142886) advanced melanoma phase II study. *Br J Cancer* 101:1724-1730.
- Bondy C, Werner H, Roberts CT, Jr., LeRoith D (1992) Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: comparison with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience* 46:909-923.
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286:1358-1362.
- Boon KL, Xiao S, McWhorter ML, Donn T, Wolf-Saxon E, Bohnsack MT, Moens CB, Beattie CE (2009) Zebrafish survival motor neuron mutants exhibit presynaptic neuromuscular junction defects. *Hum Mol Genet* 18:3615-3625.
- Bosch-Marce M, Wee CD, Martinez TL, Lipkes CE, Choe DW, Kong L, Van Meerbeke JP, Musaro A, Sumner CJ (2011) Increased IGF-1 in muscle modulates the phenotype of severe SMA mice. *Hum Mol Genet* 20:1844-1853.
- Bowerman M, Beauvais A, Anderson CL, Kothary R (2010) Rho-kinase inactivation prolongs survival of an intermediate SMA mouse model. *Hum Mol Genet* 19:1468-1478.
- Bowerman M, Murray LM, Boyer JG, Anderson CL, Kothary R (2012) Fasudil improves survival and promotes skeletal muscle development in a mouse model of spinal muscular atrophy. *BMC Med* 10:24.
- Brahe C (2000) Copies of the survival motor neuron gene in spinal muscular atrophy: the more, the better. *Neuromuscul Disord* 10:274-275.
- Brahe C, Bertini E (1996) Spinal muscular atrophies: recent insights and impact on molecular diagnosis. *J Mol Med* 74:555-562.
- Brahe C, Vitali T, Tiziano FD, Angelozzi C, Pinto AM, Borgo F, Moscato U, Bertini E, Mercuri E, Neri G (2005) Phenylbutyrate increases SMN gene expression in spinal muscular atrophy patients. *Eur J Hum Genet* 13:256-259.
- Branchu J, Biondi O, Sanchez G, Lancelin C, Deforges S, Lopes P, Pariset C, Lecolle S, Cote J, Chanoine C, Charbonnier F (2010) In vivo NMDA receptor activation accelerates motor unit maturation, protects spinal motor neurons, and enhances SMN2 gene expression in severe spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 30:11288-11299.
- Brandt S (1950) Werdnig-Hoffmann's infantile progressive muscular atrophy : clinical aspects, pathology, heredity and relation to Oppenheim's amyotonia congenita and other morbid conditions with laxity of joints or muscles in infants. *Ejnar Munksgaard*.
- Branlant C, Krol A, Ebel JP, Lazar E, Haendler B, Jacob M (1982) U2 RNA shares a structural domain with U1, U4, and U5 RNAs. *Embo J* 1:1259-1265.
- Braun S, Croizat B, Lagrange MC, Warter JM, Poindron P (1995) Constitutive muscular abnormalities in culture in spinal muscular atrophy. *Lancet* 345:694-695.
- Brichta L, Holker I, Haug K, Klockgether T, Wirth B (2006) In vivo activation of SMN in spinal muscular atrophy carriers

- and patients treated with valproate. *Ann Neurol* 59:970-975.
- Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, Siebzebrubel FA, Raschke H, Blumcke I, Eyupoglu IY, Wirth B (2003) Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 12:2481-2489.
- Briese M, Esmaeili B, Sattelle DB (2005) Is spinal muscular atrophy the result of defects in motor neuron processes? *Bioessays* 27:946-957.
- Briese M, Esmaeili B, Fraboulet S, Burt EC, Christodoulou S, Towers PR, Davies KE, Sattelle DB (2009) Deletion of smn-1, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the spinal muscular atrophy gene, results in locomotor dysfunction and reduced lifespan. *Hum Mol Genet* 18:97-104.
- Brown JC, Zeller JL, Swank SM, Furumasa J, Warath SL (1989) Surgical and functional results of spine fusion in spinal muscular atrophy. *Spine (Phila Pa 1976)* 14:763-770.
- Bruce AK, Jacobsen E, Dossing H, Kondrup J (1995) Hypoglycaemia in spinal muscular atrophy. *Lancet* 346:609-610.
- Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, Davies KE, Leppert M, Ziter F, Wood D, et al. (1990) Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* 344:540-541.
- Buchthal F, Olsen PZ (1970) Electromyography and muscle biopsy in infantile spinal muscular atrophy. *Brain* 93:15-30.
- Buhler D, Raker V, Luhrmann R, Fischer U (1999) Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 8:2351-2357.
- Burd CG, Dreyfuss G (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265:615-621.
- Burgess JW, Villablanca JR (1986) Recovery of function after neonatal or adult hemispherectomy in cats. II. Limb bias and development, paw usage, locomotion and rehabilitative effects of exercise. *Behav Brain Res* 20:1-17.
- Burghes AH (1997) When is a deletion not a deletion? When it is converted. *Am J Hum Genet* 61:9-15.
- Burghes AH, Beattie CE (2009) Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosci* 10:597-609.
- Burghes HM (2008) Other forms of survival motor neuron protein and spinal muscular atrophy: an opinion. *Neuromuscul Disord* 18:82-83.
- Burglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J (1996) Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics* 32:479-482.
- Burglen L, Seroz T, Miniou P, Lefebvre S, Burlet P, Munnich A, Pequignot EV, Egly JM, Melki J (1997) The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIF, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Hum Genet* 60:72-79.
- Burlet P, Burglen L, Clermont O, Lefebvre S, Viollet L, Munnich A, Melki J (1996) Large scale deletions of the 5q13 region are specific to Werdnig-Hoffmann disease. *J Med Genet* 33:281-283.
- Burlet P, Huber C, Bertrand S, Ludosky MA, Zwaenepoel I, Clermont O, Roume J, Delezoide AL, Cartaud J, Munnich A, Lefebvre S (1998) The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 7:1927-1933.
- Bussaglia E, Clermont O, Tizzano E, Lefebvre S, Burglen L, Cruaud C, Urtizberea JA, Colomer J, Munnich A, Baiget M, et al. (1995) A frame-shift deletion in the survival motor neuron gene in Spanish spinal muscular atrophy patients. *Nat Genet* 11:335-337.
- Butchbach ME, Singh J, Thorsteinsdottir M, Saieva L, Slominski E, Thurmond J, Andresson T, Zhang J, Edwards JD, Simard LR, Pellizzoni L, Jarecki J, Burghes AH, Gurney ME (2010) Effects of 2,4-diaminoquinazoline derivatives on SMN expression and phenotype in a mouse model for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 19:454-467.
- Butler AA, Yakar S, Gewolb IH, Karas M, Okubo Y, LeRoith D (1998) Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 121:19-26.
- Byers RK, Banker BQ (1961) Infantile muscular atrophy. *Arch Neurol* 5:140-164.
- Cameron HA, McEwen BS, Gould E (1995) Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci* 15:4687-4692.
- Cameron HA, Hazel TG, McKay RD (1998) Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol* 36:287-306.
- Cameron WE, Nunez-Abades PA (2000) Physiological changes accompanying anatomical remodeling of mammalian motoneurons during postnatal development. *Brain Res Bull* 53:523-527.
- Cameron WE, Fang H, Brozanski BS, Guthrie RD (1989) The postnatal growth of motoneurons at three levels of the cat neuraxis. *Neurosci Lett* 104:274-280.
- Campbell D, Mann BJ, Chadee K (2000) A subunit vaccine candidate region of the *Entamoeba histolytica* galactose-adherence lectin promotes interleukin-12 gene transcription and protein production in human macrophages. *Eur J Immunol* 30:423-430.
- Campbell L, Potter A, Ignatius J, Dubowitz V, Davies K (1997) Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 61:40-50.
- Caraballo-Miralles V, Cardona-Rossinyol A, Garcera A, Villalonga P, Soler RM, Olmos G, Llado J (2012) SMN deficiency attenuates migration of U87MG astrogloma cells through the activation of RhoA. *Mol Cell Neurosci* 49:282-289.
- Carissimi C, Saieva L, Gabanella F, Pellizzoni L (2006) Gemin8 is required for the architecture and function of the survival motor neuron complex. *J Biol Chem* 281:37009-37016.
- Carrel TL, McWhorter ML, Workman E, Zhang H, Wolstencroft EC, Lorson C, Bassell GJ, Burghes AH, Beattie CE (2006) Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis. *J Neurosci* 26:11014-11022.
- Carro E, Torres-Aleman I (2006) Serum insulin-like growth factor I in brain function. *Keio J Med* 55:59-63.
- Carro E, Nunez A, Busiguina S, Torres-Aleman I (2000) Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci* 20:2926-2933.
- Carro E, Trejo JL, Busiguina S, Torres-Aleman I (2001) Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of

- different etiology and anatomy. *J Neurosci* 21:5678-5684.
- Cartegni L, Krainer AR (2002) Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet* 30:377-384.
- Cartegni L, Krainer AR (2003) Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat Struct Biol* 10:120-125.
- Cartegni L, Hastings ML, Calarco JA, de Stanchina E, Krainer AR (2006) Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am J Hum Genet* 78:63-77.
- Carter TA, Bonnemann CG, Wang CH, Obici S, Parano E, De Fatima Bonaldo M, Ross BM, Penschaszadeh GK, Mackenzie A, Soares MB, Kunkel LM, Gilliam TC (1997) A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions. *Hum Mol Genet* 6:229-236.
- Cha YK, Kim YH, Ahn YH, Koh JY (2000) Epidermal growth factor induces oxidative neuronal injury in cortical culture. *J Neurochem* 75:298-303.
- Chan YB, Miguel-Aliaga I, Franks C, Thomas N, Trulzsch B, Sattelle DB, Davies KE, van den Heuvel M (2003) Neuromuscular defects in a Drosophila survival motor neuron gene mutant. *Hum Mol Genet* 12:1367-1376.
- Chang HC, Hung WC, Chuang YJ, Jong YJ (2004) Degradation of survival motor neuron (SMN) protein is mediated via the ubiquitin/proteasome pathway. *Neurochem Int* 45:1107-1112.
- Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, Wang NM, Tsai CH, Li H (2001) Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9808-9813.
- Chang JG, Jong YJ, Huang JM, Wang WS, Yang TY, Chang CP, Chen YJ, Lin SP (1995) Molecular basis of spinal muscular atrophy in Chinese. *Am J Hum Genet* 57:1503-1505.
- Chang T, Gieron-Korthals M (2011) Spinal muscular atrophy: an update. *Fetal Pediatr Pathol* 30:130-136.
- Charcot J, Marie P (1886) Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive souvent familiale débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Rev Med* 6:97-138.
- Chari A, Golas MM, Klingenhager M, Neuenkirchen N, Sander B, Englbrecht C, Sickmann A, Stark H, Fischer U (2008) An assembly chaperone collaborates with the SMN complex to generate spliceosomal snRNPs. *Cell* 135:497-509.
- Charroux B, Pellizzoni L, Perkinson RA, Shevchenko A, Mann M, Dreyfuss G (1999) Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. *J Cell Biol* 147:1181-1194.
- Charroux B, Pellizzoni L, Perkinson RA, Yong J, Shevchenko A, Mann M, Dreyfuss G (2000) Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J Cell Biol* 148:1177-1186.
- Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415:793-798.
- Chen HS, Lipton SA (2006) The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* 97:1611-1626.
- Chen PE, Wyllie DJ (2006) Pharmacological insights obtained from structure-function studies of ionotropic glutamate receptors. *Br J Pharmacol* 147:839-853.
- Chen Q, Baird SD, Mahadevan M, Besner-Johnston A, Farahani R, Xuan J, Kang X, Lefebvre C, Ikeda JE, Korneluk RG, MacKenzie AE (1998) Sequence of a 131-kb region of 5q13.1 containing the spinal muscular atrophy candidate genes SMN and NAIP. *Genomics* 48:121-127.
- Chen YC, Yuo CY, Yang WK, Jong YJ, Lin HH, Chang YS, Chang JG (2008) Extracellular pH change modulates the exon 7 splicing in SMN2 mRNA. *Mol Cell Neurosci* 39:268-272.
- Chen YS, Shih HH, Chen TH, Kuo CH, Jong YJ (2011) Prevalence and Risk Factors for Feeding and Swallowing Difficulties in Spinal Muscular Atrophy Types II and III. *J Pediatr*.
- Cheung NS, Koh CH, Bay BH, Qi RZ, Choy MS, Li QT, Wong KP, Whiteman M (2004) Chronic exposure to U18666A induces apoptosis in cultured murine cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 315:408-417.
- Chin CN, Dallas-Yang Q, Liu F, Ho T, Ellsworth K, Fischer P, Natasha T, Ireland C, Lu P, Li C, Wang IM, Strohl W, Berger JP, An Z, Zhang BB, Jiang G (2009) Evidence that inhibition of insulin receptor signaling activity by PC-1/ENPP1 is dependent on its enzyme activity. *Eur J Pharmacol* 606:17-24.
- Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, Pollak M, Macaulay VM (2008) The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin Cancer Res* 14:6364-6370.
- Cho S, Dreyfuss G (2010) A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity. *Genes Dev* 24:438-442.
- Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634.
- Ciabarra AM, Sullivan JM, Gahn LG, Pecht G, Heinemann S, Sevarino KA (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci* 15:6498-6508.
- Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, Lacene E, Roblot N, Joshi V, Moreau MH, Melki J (2001) Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J Cell Biol* 152:1107-1114.
- Cifuentes-Diaz C, Nicole S, Velasco ME, Borra-Cebrian C, Panozzo C, Frugier T, Millet G, Roblot N, Joshi V, Melki J (2002) Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum Mol Genet* 11:1439-1447.
- Cisterni C, Kallenbach S, Jordier F, Bagnis C, Pettmann B (2001) Death of motoneurons induced by trophic deprivation or by excitotoxicity is not prevented by overexpression of SMN. *Neurobiol Dis* 8:240-251.
- Claus P, Doring F, Gringel S, Muller-Ostermeyer F, Fuhrott J, Kraft T, Grothe C (2003) Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival of motoneuron protein. *J Biol Chem* 278:479-485.
- Clelland AK, Bales AB, Sleeman JE (2012) Changes in intranuclear mobility of mature snRNPs provide a mechanism for splicing defects in spinal muscular atrophy. *J Cell Sci* 125:2626-2637.
- Clermont O, Burlet P, Lefebvre S, Burglen L, Munnich A, Melki J (1995) SMN gene deletions in adult-onset spinal muscular atrophy. *Lancet* 346:1712-1713.

- Clermont O, Burlet P, Burglen L, Lefebvre S, Pascal F, McPherson J, Wasmuth JJ, Cohen D, Le Paslier D, Weissenbach J, et al. (1994) Use of genetic and physical mapping to locate the spinal muscular atrophy locus between two new highly polymorphic DNA markers. *Am J Hum Genet* 54:687-694.
- Cobben JM, van der Steege G, Grootsholten P, de Visser M, Scheffer H, Buys CH (1995) Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 57:805-808.
- Cohen E, Paulsson JF, Blinder P, Burstyn-Cohen T, Du D, Estepa G, Adame A, Pham HM, Holzenberger M, Kelly JW, Masliah E, Dillin A (2009) Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. *Cell* 139:1157-1169.
- Cohick WS, Clemmons DR (1993) The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 55:131-153.
- Coleman ME, DeMayo F, Yin KC, Lee HM, Geske R, Montgomery C, Schwartz RJ (1995) Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem* 270:12109-12116.
- Colucci-D'Amato L, Perrone-Capano C, di Porzio U (2003) Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases. *Bioessays* 25:1085-1095.
- Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, Coulson SE, Androphy EJ, Prior TW, Burghes AH (1997) The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 6:1205-1214.
- Corbo M, Lunetta C, Magni P, Dozio E, Ruscica M, Adobbati L, Silani V (2010) Free insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding proteins-2 and -3 in serum and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Eur J Neurol* 17:398-404.
- Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D, Simone C, Falcone M, Papadimitriou D, Locatelli F, Mezzina N, Gianni F, Bresolin N, Comi GP (2010) Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice. *Brain* 133:465-481.
- Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D, Saladino F, Bordoni A, Fortunato F, Del Bo R, Papadimitriou D, Locatelli F, Menozzi G, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP (2008) Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 118:3316-3330.
- Crair MC, Malenka RC (1995) A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature* 375:325-328.
- Cramer P, Pesce CG, Baralle FE, Kornblihtt AR (1997) Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11456-11460.
- Crossthwaite AJ, Valli H, Williams RJ (2004) Inhibiting Src family tyrosine kinase activity blocks glutamate signalling to ERK1/2 and Akt/PKB but not JNK in cultured striatal neurones. *J Neurochem* 88:1127-1139.
- Cui SS, Yang CP, Bowen RC, Bai O, Li XM, Jiang W, Zhang X (2003) Valproic acid enhances axonal regeneration and recovery of motor function after sciatic nerve axotomy in adult rats. *Brain Res* 975:229-236.
- Culetto E, Sattelle DB (2000) A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum Mol Genet* 9:869-877.
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004:re16.
- Cusin V, Clermont O, Gérard B, Chanterreau D, Elion J (2003) Prevalence of SMN1 deletion and duplication in carrier and normal populations: implication for genetic counselling. *J Med Genet* 40:39.
- Czeizel A, Hamula J (1989) A Hungarian study on Werdnig-Hoffmann disease. *J Med Genet* 26:761-763.
- Dai Z, Peng HB (1995) Presynaptic differentiation induced in cultured neurons by local application of basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 15:5466-5475.
- Daniels RJ, Suthers GK, Morrison KE, Thomas NH, Francis MJ, Mathew CG, Loughlin S, Heiberg A, Wood D, Dubowitz V, et al. (1992) Prenatal prediction of spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 29:165-170.
- Darbar IA, Plaggert PG, Resende MB, Zanoteli E, Reed UC (2011) Evaluation of muscle strength and motor abilities in children with type II and III spinal muscle atrophy treated with valproic acid. *BMC Neurol* 11:36.
- Davies KE, Thomas NH, Daniels RJ, Dubowitz V (1991) Molecular studies of spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 1:83-85.
- Deforges S, Branchu J, Biondi O, Grondard C, Pariset C, Lecolle S, Lopes P, Vidal PP, Chanoine C, Charbonnier F (2009) Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 587:3561-3572.
- Demir O, Aysit N, Onder Z, Turkel N, Ozturk G, Sharrocks AD, Kurnaz IA (2011) ETS-domain transcription factor Elk-1 mediates neuronal survival: SMN as a potential target. *Biochim Biophys Acta* 1812:652-662.
- Detich N, Bovenzi V, Szyf M (2003) Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J Biol Chem* 278:27586-27592.
- Deveraux QL, Reed JC (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13:239-252.
- Dey BR, Furlanetto RW, Nissley P (2000) Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 protein interacts with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 278:38-43.
- Dey BR, Spence SL, Nissley P, Furlanetto RW (1998) Interaction of human suppressor of cytokine signaling (SOCS)-2 with the insulin-like growth factor-I receptor. *J Biol Chem* 273:24095-24101.
- Dick J, Greensmith L, Vrbova G (1995) Blocking of NMDA receptors during a critical stage of development reduces the effects of nerve injury at birth on muscles and motoneurons. *Neuromuscul Disord* 5:371-382.
- DiDonato CJ, Parks RJ, Kothary R (2003) Development of a gene therapy strategy for the restoration of survival motor neuron protein expression: implications for spinal muscular atrophy therapy. *Hum Gene Ther* 14:179-188.
- DiDonato CJ, Chen XN, Noya D, Korenberg JR, Nadeau JH, Simard LR (1997) Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. *Genome Res* 7:339-352.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Doble A (1999) The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 81:163-221.
- Dodd A, Curtis PM, Williams LC, Love DR (2000) Zebrafish: bridging the gap between development and disease. *Hum Mol Genet* 9:2443-2449.

- Doktor TK, Schroeder LD, Vested A, Palmfeldt J, Andersen HS, Gregersen N, Andresen BS (2011) SMN2 exon 7 splicing is inhibited by binding of hnRNP A1 to a common ESS motif that spans the 3' splice site. *Hum Mutat* 32:220-230.
- Dominguez E, Marais T, Chatauret N, Benkhalifa-Ziyyat S, Duque S, Ravassard P, Carcenac R, Astord S, Pereira de Moura A, Voit T, Barkats M (2011) Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice. *Hum Mol Genet* 20:681-693.
- Dore S, Kar S, Quirion R (1997) Rediscovering an old friend, IGF-I: potential use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 20:326-331.
- Dowhan DH, Hong EP, Auboeuf D, Dennis AP, Wilson MM, Berget SM, O'Malley BW (2005) Steroid hormone receptor coactivation and alternative RNA splicing by U2AF65-related proteins CAPERalpha and CAPERbeta. *Mol Cell* 17:429-439.
- Dreyfuss G, Matunis MJ, Pinol-Roma S, Burd CG (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 62:289-321.
- Duan C, Ren H, Gao S (2010) Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 167:344-351.
- Dubowitz V (1964) Infantile Muscular Atrophy. a Prospective Study with Particular Reference to a Slowly Progressive Variety. *Brain* 87:707-718.
- Duchenne G-B (1872) De l'électrisation localisée et de son application à la physiologie, la pathologie et la thérapeutique. *JB Baillière et fils*.
- Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275:661-665.
- Dupe V, Davenne M, Brocard J, Dolle P, Mark M, Dierich A, Chambon P, Rijli FM (1997) In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* 124:399-410.
- Echaniz-Laguna A, Miniou P, Bartholdi D, Melki J (1999) The promoters of the survival motor neuron gene (SMN) and its copy (SMNc) share common regulatory elements. *Am J Hum Genet* 64:1365-1370.
- Edgerton VR, Roy RR, Hodgson JA, Prober RJ, de Guzman CP, de Leon R (1991) A physiological basis for the development of rehabilitative strategies for spinally injured patients. *J Am Paraplegia Soc* 14:150-157.
- Eggert C, Chari A, Lagerbauer B, Fischer U (2006) Spinal muscular atrophy: the RNP connection. *Trends Mol Med* 12:113-121.
- Emery AE (1991) Clinical and genetic heterogeneity in spinal muscular atrophy--the multiple allele model. *Neuromuscul Disord* 1:307-308.
- Epstein HF, Fischman DA (1991) Molecular analysis of protein assembly in muscle development. *Science* 251:1039-1044.
- Espert L, Eldin P, Gongora C, Bayard B, Harper F, Chelbi-Alix MK, Bertrand E, Degols G, Mechti N (2006) The exonuclease ISG20 mainly localizes in the nucleolus and the Cajal (Coiled) bodies and is associated with nuclear SMN protein-containing complexes. *J Cell Biochem* 98:1320-1333.
- Eves EM, Xiong W, Bellacosa A, Kennedy SG, Tsichlis PN, Rosner MR, Hay N (1998) Akt, a target of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits apoptosis in a differentiating neuronal cell line. *Mol Cell Biol* 18:2143-2152.
- Fallini C, Bassell GJ, Rossoll W (2012) Spinal muscular atrophy: the role of SMN in axonal mRNA regulation. *Brain Res* 1462:81-92.
- Fan L, Simard LR (2002) Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum Mol Genet* 11:1605-1614.
- Farah CS, Reinach FC (1995) The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J* 9:755-767.
- Farooq F, Balabanian S, Liu X, Holcik M, MacKenzie A (2009) p38 Mitogen-activated protein kinase stabilizes SMN mRNA through RNA binding protein HuR. *Hum Mol Genet* 18:4035-4045.
- Favero M, Lorenzetto E, Bidoia C, Buffelli M, Busetto G, Cangiano A (2007) Synapse formation and elimination: role of activity studied in different models of adult muscle reinnervation. *J Neurosci Res* 85:2610-2619.
- Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B (2002) Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 70:358-368.
- Ferraiuolo L, De Bono JP, Heath PR, Holden H, Kasher P, Channon KM, Kirby J, Shaw PJ (2009) Transcriptional response of the neuromuscular system to exercise training and potential implications for ALS. *J Neurochem* 109:1714-1724.
- Ferrer-Alcon M, Winkler-Hirt C, Madani R, Perrin FE, Kato AC (2008) Low intensity exercise attenuates disease progression and stimulates cell proliferation in the spinal cord of a mouse model with progressive motor neuronopathy. *Neuroscience* 152:291-295.
- Fidzianska A, Rafalowska J (2002) Motoneuron death in normal and spinal muscular atrophy-affected human fetuses. *Acta Neuropathol* 104:363-368.
- Fidzianska A, Rafalowska J, Glinka Z (1984) Ultrastructural study of motoneurons in Werdnig-Hoffmann disease. *Clin Neuropathol* 3:260-265.
- Fidzianska A, Goebel HH, Warlo I (1990) Acute infantile spinal muscular atrophy. Muscle apoptosis as a proposed pathogenetic mechanism. *Brain* 113 (Pt 2):433-445.
- Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME (1997) CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 19:1031-1047.
- Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 90:1023-1029.
- Fisher BE, Petzinger GM, Nixon K, Hogg E, Bremner S, Meshul CK, Jakowec MW (2004) Exercise-induced behavioral recovery and neuroplasticity in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse basal ganglia. *J Neurosci Res* 77:378-390.
- Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA (1996) Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* 17:481-517.
- Forss-Petter S, Danielson PE, Catsicas S, Battenberg E, Price J, Nerenberg M, Sutcliffe JG (1990) Transgenic mice expressing beta-galactosidase in mature neurons under neuron-specific enolase promoter control. *Neuron* 5:187-197.
- Foust KD, Wang X, McGovern VL, Braun L, Bevan AK, Haidet AM, Le TT, Morales PR, Rich MM, Burghes AH, Kaspar BK (2010) Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat Biotechnol* 28:271-274.
- Fox BP, Kandpal RP (2006) Transcriptional silencing of EphB6 receptor tyrosine kinase in invasive breast carcinoma

- cells and detection of methylated promoter by methylation specific PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 340:268-276.
- Francis MJ, Morrison KE, Campbell L, Grewal PK, Christodoulou Z, Daniels RJ, Monaco AP, Frischauf AM, McPherson J, Wasmuth J, et al. (1993) A contig of non-chimaeric YACs containing the spinal muscular atrophy gene in 5q13. *Hum Mol Genet* 2:1161-1167.
- Fredericks EJ, Russman BS (1979) Bedside evaluation of large motor units in childhood spinal muscular atrophy. *Neurology* 29:398-400.
- Fried K, Mundel G (1977) High incidence of spinal muscular atrophy type I (Werdnig - Hoffmann disease) in the Karaite community in Israel. *Clin Genet* 12:250-251.
- Friesen WJ, Dreyfuss G (2000) Specific sequences of the Sm and Sm-like (Lsm) proteins mediate their interaction with the spinal muscular atrophy disease gene product (SMN). *J Biol Chem* 275:26370-26375.
- Friesen WJ, Massenet S, Paushkin S, Wyce A, Dreyfuss G (2001) SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Mol Cell* 7:1111-1117.
- Friesen WJ, Wyce A, Paushkin S, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2002) A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. *J Biol Chem* 277:8243-8247.
- Frugier T, Tiziano FD, Cifuentes-Diaz C, Miniou P, Roblot N, Dierich A, Le Meur M, Melki J (2000) Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 9:849-858.
- Fujak A, Kopschina C, Forst R, Mueller LA, Forst J (2011) Use of orthoses and orthopaedic technical devices in proximal spinal muscular atrophy. Results of survey in 194 SMA patients. *Disabil Rehabil Assist Technol* 6:305-311.
- Fujak A, Kopschina C, Forst R, Gras F, Mueller LA, Forst J (2010) Fractures in proximal spinal muscular atrophy. *Arch Orthop Trauma Surg* 130:775-780.
- Fukaya M, Hayashi Y, Watanabe M (2005) NR2 to NR3B subunit switchover of NMDA receptors in early postnatal motoneurons. *Eur J Neurosci* 21:1432-1436.
- Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438:185-192.
- Gabanella F, Carissimi C, Usiello A, Pellizzoni L (2005) The activity of the spinal muscular atrophy protein is regulated during development and cellular differentiation. *Hum Mol Genet* 14:3629-3642.
- Gabanella F, Butchbach ME, Saieva L, Carissimi C, Burghes AH, Pellizzoni L (2007) Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. *PLoS One* 2:e921.
- Galea V, Fehlings D, Kirsch S, McComas A (2001) Depletion and sizes of motor units in spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* 24:1168-1172.
- Gall JG (2000) Cajal bodies: the first 100 years. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:273-300.
- Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, Jorgensen OS (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* 7:2203-2213.
- Gambardella A, Mazzei R, Toscano A, Annesi G, Pasqua A, Annesi F, Quattrone F, Oliveri RL, Valentino P, Bono F, Aguglia U, Zappia M, Vita G, Quattrone A (1998) Spinal muscular atrophy due to an isolated deletion of exon 8 of the telomeric survival motor neuron gene. *Ann Neurol* 44:836-839.
- Gangwani L, Mikrut M, Theroux S, Sharma M, Davis RJ (2001) Spinal muscular atrophy disrupts the interaction of ZPR1 with the SMN protein. *Nat Cell Biol* 3:376-383.
- Gardiner P, Dai Y, Heckman CJ (2006) Effects of exercise training on alpha-motoneurons. *J Appl Physiol* 101:1228-1236.
- Gardoni F (2008) MAGUK proteins: new targets for pharmacological intervention in the glutamatergic synapse. *Eur J Pharmacol* 585:147-152.
- Gardoni F, Caputi A, Cimino M, Pastorino L, Cattabeni F, Di Luca M (1998) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with NR2A/B subunits of NMDA receptor in postsynaptic densities. *J Neurochem* 71:1733-1741.
- Gardoni F, Schrama LH, Kamal A, Gispén WH, Cattabeni F, Di Luca M (2001) Hippocampal synaptic plasticity involves competition between Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and postsynaptic density 95 for binding to the NR2A subunit of the NMDA receptor. *J Neurosci* 21:1501-1509.
- Geisler HC, Westerga J, Gramsbergen A (1993) Development of posture in the rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 53:517-523.
- Gennarelli M, Lucarelli M, Capon F, Pizzuti A, Merlini L, Angelini C, Novelli G, Dallapiccola B (1995) Survival motor neuron gene transcript analysis in muscles from spinal muscular atrophy patients. *Biochem Biophys Res Commun* 213:342-348.
- Germain-Desprez D, Brun T, Rochette C, Semionov A, Rouget R, Simard LR (2001) The SMN genes are subject to transcriptional regulation during cellular differentiation. *Gene* 279:109-117.
- Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME (1994) Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263:1618-1623.
- Gibney V (1886) Is there a primary cord lesion in pseudohypertrophic paralysis ? *J Ment Nerv Dis* 3:572-574.
- Gieseemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, Jockusch H (1999) A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem* 274:37908-37914.
- Gille H, Strahl T, Shaw PE (1995) Activation of ternary complex factor Elk-1 by stress-activated protein kinases. *Curr Biol* 5:1191-1200.
- Gilliam TC, Brzustowicz LM, Castilla LH, Lehner T, Penchaszadeh GK, Daniels RJ, Byth BC, Knowles J, Hislop JE, Shapira Y, et al. (1990) Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature* 345:823-825.
- Giudice LC (1992) Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr Rev* 13:641-669.
- Glascok J, Osman EY, Wetz MJ, Krogman MM, Shababi M, Lorson C (2011) Decreasing disease severity in symptomatic Spinal Muscular Atrophy mice following scAAV9-SMN delivery. *Hum Gene Ther*.
- Glenney JR, Jr., Geisler N, Kaulfus P, Weber K (1981) Demonstration of at least two different actin-binding sites in villin, a calcium-regulated modulator of F-actin organization. *J Biol Chem* 256:8156-8161.
- Gokhin DS, Ward SR, Bremner SN, Lieber RL (2008) Quantitative analysis of neonatal skeletal muscle functional improvement in the mouse. *J Exp Biol* 211:837-843.
- Gotz R (2000) Regulation of neuronal cell death and differentiation by NGF and IAP family members. *J Neural Transm Suppl*:247-259.
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree

- shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17:2492-2498.
- Granata C, Cervellati S, Ballestrazzi A, Corbascio M, Merlini L (1993) Spine surgery in spinal muscular atrophy: long-term results. *Neuromuscul Disord* 3:207-215.
- Greensmith L, Vrbova G (1991) Neuromuscular contacts in the developing rat soleus depend on muscle activity. *Brain Res Dev Brain Res* 62:121-129.
- Greensmith L, Vrbova G (1992) Alterations of nerve-muscle interaction during postnatal development influence motoneuron survival in rats. *Brain Res Dev Brain Res* 69:125-131.
- Grondard C, Biondi O, Armand AS, Lecolle S, Della Gaspera B, Pariset C, Li H, Gallien CL, Vidal PP, Chanoine C, Charbonnier F (2005) Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* 25:7615-7622.
- Grunwald DJ, Eisen JS (2002) Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet* 3:717-724.
- Grzeschik SM, Ganta M, Prior TW, Heavlin WD, Wang CH (2005) Hydroxyurea enhances SMN2 gene expression in spinal muscular atrophy cells. *Ann Neurol* 58:194-202.
- Gubitz AK, Mourelatos Z, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2002) Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J Biol Chem* 277:5631-5636.
- Guettier-Sigrist S, Hugel B, Coupin G, Freyssinet JM, Poindron P, Warter JM (2002) Possible pathogenic role of muscle cell dysfunction in motor neuron death in spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* 25:700-708.
- Guettier-Sigrist S, Coupin G, Braun S, Rogovitz D, Courdier I, Warter JM, Poindron P (2001) On the possible role of muscle in the pathogenesis of spinal muscular atrophy. *Fundam Clin Pharmacol* 15:31-40.
- Gunadi, Sasongko TH, Yusoff S, Lee MJ, Nishioka E, Matsuo M, Nishio H (2008) Hypomutability at the polyadenine tract in SMN intron 3 shows the invariability of the a-SMN protein structure. *Ann Hum Genet* 72(Pt 2):288-291.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliando J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772-1775.
- Hachiya Y, Arai H, Hayashi M, Kumada S, Furushima W, Ohtsuka E, Ito Y, Uchiyama A, Kurata K (2005) Autonomic dysfunction in cases of spinal muscular atrophy type 1 with long survival. *Brain Dev* 27:574-578.
- Haddad H, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, Roblot N, Joshi V, Melki J (2003) Riluzole attenuates spinal muscular atrophy disease progression in a mouse model. *Muscle Nerve* 28:432-437.
- Hahnen E, Schonling J, Rudnik-Schoneborn S, Raschke H, Zerres K, Wirth B (1997) Missense mutations in exon 6 of the survival motor neuron gene in patients with spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mol Genet* 6:821-825.
- Hahnen E, Eyupoglu IY, Brichta L, Haastert K, Trankle C, Siebzehnrbul FA, Riessland M, Holker I, Claus P, Romstock J, Buslei R, Wirth B, Blumcke I (2006) In vitro and ex vivo evaluation of second-generation histone deacetylase inhibitors for the treatment of spinal muscular atrophy. *J Neurochem* 98:193-202.
- Hamburger V (1992) History of the discovery of neuronal death in embryos. *J Neurobiol* 23:1116-1123.
- Hao le T, Wolman M, Granato M, Beattie CE (2012) Survival motor neuron affects plastin 3 protein levels leading to motor defects. *J Neurosci* 32:5074-5084.
- Harada Y, Sutomo R, Sadewa AH, Akutsu T, Takeshima Y, Wada H, Matsuo M, Nishio H (2002) Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity. *J Neurol* 249:1211-1219.
- Harcourt LJ, Schertzer JD, Ryall JG, Lynch GS (2007) Low dose formoterol administration improves muscle function in dystrophic mdx mice without increasing fatigue. *Neuromuscul Disord* 17:47-55.
- Hardingham GE, Bading H (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 26:81-89.
- Harkema SJ, Hurley SL, Patel UK, Requejo PS, Dobkin BH, Edgerton VR (1997) Human lumbosacral spinal cord interprets loading during stepping. *J Neurophysiol* 77:797-811.
- Hastings ML, Berniac J, Liu YH, Abato P, Jodelka FM, Barthel L, Kumar S, Dudley C, Nelson M, Larson K, Edmonds J, Bowser T, Draper M, Higgins P, Krainer AR (2009) Tetracyclines that promote SMN2 exon 7 splicing as therapeutics for spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med* 1:5ra12.
- Hauke J, Riessland M, Lunke S, Eyupoglu IY, Blumcke I, El-Osta A, Wirth B, Hahnen E (2009) Survival motor neuron gene 2 silencing by DNA methylation correlates with spinal muscular atrophy disease severity and can be bypassed by histone deacetylase inhibition. *Hum Mol Genet* 18:304-317.
- Hausmanowa-Petrusewicz I (1988) Electrophysiological findings in childhood spinal muscular atrophies. *Rev Neurol (Paris)* 144:716-720.
- Hausmanowa-Petrusewicz I, Karwanska A (1986) Electromyographic findings in different forms of infantile and juvenile proximal spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* 9:37-46.
- Hausmanowa-Petrusewicz I, Zaremba J, Borkowska J (1979) Chronic form of childhood spinal muscular atrophy. Are the problems of its genetics really solved? *J Neurol Sci* 43:317-327.
- Hayashi M, Araki S, Arai N, Kumada S, Itoh M, Tamagawa K, Oda M, Morimatsu Y (2002) Oxidative stress and disturbed glutamate transport in spinal muscular atrophy. *Brain Dev* 24:770-775.
- Hebert MD, Szymczyk PW, Shpargel KB, Matera AG (2001) Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes Dev* 15:2720-2729.
- Heier CR, Gogliotti RG, DiDonato CJ (2007) SMN transcript stability: could modulation of messenger RNA degradation provide a novel therapy for spinal muscular atrophy? *J Child Neurol* 22:1013-1018.
- Heier CR, Satta R, Lutz C, DiDonato CJ (2010) Arrhythmia and cardiac defects are a feature of spinal muscular atrophy model mice. *Hum Mol Genet* 19:3906-3918.
- Hendrickson BC, Donohoe C, Akmaev VR, Sugarman EA, Labrousse P, Boguslavskiy L, Flynn K, Rohlfis EM, Walker A, Allitto B, Sears C, Scholl T (2009) Differences in SMN1 allele frequencies among ethnic groups within North America. *J Med Genet* 46:641-644.
- Hergersberg M, Glatzel M, Capone A, Achermann S, Hagmann A, Fischer J, Ersch J, Aguzzi A, Boltshauser E (2000) Deletions in the spinal muscular atrophy gene region in a newborn with neuropathy and extreme generalized muscular weakness. *Eur J Paediatr Neurol* 4:35-38.

- Hoffmann J (1893) Ueber chronische spinale Muskelatrophie im Kindsalter, auf familiärer Basis. *Dtsch Z Nervenheilkd* 3:427-470.
- Hofmann Y, Wirth B (2002) hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1. *Hum Mol Genet* 11:2037-2049.
- Hofmann Y, Lorson CL, Stamm S, Androphy EJ, Wirth B (2000) Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9618-9623.
- Hollis ER, 2nd, Jamshidi P, Low K, Blesch A, Tuszynski MH (2009) Induction of corticospinal regeneration by lentiviral trkB-induced Erk activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7215-7220.
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloen A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421:182-187.
- Holzer N, Ziltener JL, Menetrey J (2006) [Plasticity of striated skeletal muscle: training effect and perspectives]. *Rev Med Suisse* 2:1798-1804.
- Hori Y, Kanda K (1996) Developmental alterations in NMDA receptor-mediated currents in neonatal rat spinal motoneurons. *Neurosci Lett* 205:99-102.
- Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, Li H (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 24:66-70.
- Hua Y, Zhou J (2004) Rpp20 interacts with SMN and is re-distributed into SMN granules in response to stress. *Biochem Biophys Res Commun* 314:268-276.
- Hua Y, Sahashi K, Rigo F, Hung G, Horev G, Bennett CF, Krainer AR (2011) Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* 478:123-126.
- Huang M, Lai WP, Wong MS, Yang M (2001) Effect of receptor phosphorylation on the binding between IRS-1 and IGF-1R as revealed by surface plasmon resonance biosensor. *FEBS Lett* 505:31-36.
- Iannaccone ST, Browne RH, Samaha FJ, Buncher CR (1993) Prospective study of spinal muscular atrophy before age 6 years. DCN/SMA Group. *Pediatr Neurol* 9:187-193.
- Ignatius J, Donner M (1989) Epidemiology of childhood spinal muscular atrophy. *Lang H, ed Lihastautien Kehittyvä Tutkimus Ja hoito Turku Kiasma*.
- Ikonomidou C, Stefovská V, Turski L (2000) Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12885-12890.
- Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovská V, Turski L, Olney JW (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283:70-74.
- Inaba M, Saito H, Fujimoto M, Sumitani S, Ohkawara T, Tanaka T, Kouhara H, Kasayama S, Kawase I, Kishimoto T, Naka T (2005) Suppressor of cytokine signaling 1 suppresses muscle differentiation through modulation of IGF-I receptor signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* 328:953-961.
- Inturrisi CE (2005) The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain and morphine tolerance. *Minerva Anesthesiol* 71:401-403.
- Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M, et al. (1993) Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* 268:2836-2843.
- Ishikawa Y, Bach JR (2010) Physical medicine respiratory muscle aids to avert respiratory complications of pediatric chest wall and vertebral deformity and muscle dysfunction. *Eur J Phys Rehabil Med* 46:581-597.
- Iwahashi H, Eguchi Y, Yasuhara N, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Tsujimoto Y (1997) Synergistic anti-apoptotic activity between Bcl-2 and SMN implicated in spinal muscular atrophy. *Nature* 390:413-417.
- Iwashita K, Sugi Y, Higa K, Katori K, Nitahara K (2008) [Anesthetic management of a patient with spinal muscular atrophy type III]. *Masui* 57:358-359.
- Jablonka S, Beck M, Lechner BD, Mayer C, Sendtner M (2007) Defective Ca²⁺ channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* 179:139-149.
- Jablonka S, Bandilla M, Wiese S, Buhler D, Wirth B, Sendtner M, Fischer U (2001) Co-regulation of survival of motor neuron (SMN) protein and its interactor SIP1 during development and in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 10:497-505.
- Jamon M, Clarac F (1998) Early walking in the neonatal rat: a kinematic study. *Behav Neurosci* 112:1218-1228.
- Jansson D, Ng AC, Fu A, Depatie C, Al Azzabi M, Srean RA (2008) Glucose controls CREB activity in islet cells via regulated phosphorylation of TORC2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10161-10166.
- Jarecki J, Chen X, Bernardino A, Coover DD, Whitney M, Burghes A, Stack J, Pollok BA (2005) Diverse small-molecule modulators of SMN expression found by high-throughput compound screening: early leads towards a therapeutic for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 14:2003-2018.
- Jasmin BJ, Antony C, Changeux JP, Cartaud J (1995) Nerve-dependent plasticity of the Golgi complex in skeletal muscle fibres: compartmentalization within the subneural sarcoplasm. *Eur J Neurosci* 7:470-479.
- Jedrejowska M, Milewski M, Zimowski J, Zagodzón P, Kostera-Pruszyk A, Borkowska J, Sielska D, Jurek M, Hausmanowa-Petrusewicz I (2010) Incidence of spinal muscular atrophy in Poland—more frequent than predicted? *Neuroepidemiology* 34:152-157.
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080.
- Jeong MR, Hashimoto R, Senatorov VV, Fujimaki K, Ren M, Lee MS, Chuang DM (2003) Valproic acid, a mood stabilizer and anticonvulsant, protects rat cerebral cortical neurons from spontaneous cell death: a role of histone deacetylase inhibition. *FEBS Lett* 542:74-78.
- Jiang Z, Rempel J, Li J, Sawchuk MA, Carlin KP, Brownstone RM (1999) Development of L-type calcium channels and a nifedipine-sensitive motor activity in the postnatal mouse spinal cord. *Eur J Neurosci* 11:3481-3487.
- Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J (2011) Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (Aβeta) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-α (sAPP(α)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3β pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* 286:18414-18425.
- Jodelka FM, Ebert AD, Duelli DM, Hastings ML (2010) A feedback loop regulates splicing of the spinal muscular atrophy-modifying gene, SMN2. *Hum Mol Genet* 19:4906-4917.
- Johnson CM, Hill CS, Chawla S, Treisman R, Bading H (1997) Calcium controls gene expression via three distinct pathways that can function independently of the

- Ras/mitogen-activated protein kinases (ERKs) signaling cascade. *J Neurosci* 17:6189-6202.
- Jones JL, Clemmons DR (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16:3-34.
- Jones KW, Gorzynski K, Hales CM, Fischer U, Badbanchi F, Terns RM, Terns MP (2001) Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J Biol Chem* 276:38645-38651.
- Joo JY, Kim BW, Lee JS, Park JY, Kim S, Yun YJ, Lee SH, Rhim H, Son H (2007) Activation of NMDA receptors increases proliferation and differentiation of hippocampal neural progenitor cells. *J Cell Sci* 120:1358-1370.
- Jordan BA, Fernholz BD, Khatri L, Ziff EB (2007) Activity-dependent AIDA-1 nuclear signaling regulates nucleolar numbers and protein synthesis in neurons. *Nat Neurosci* 10:427-435.
- Jordanova A, Kargaci V, Kremensky I, Litvinenko I, Uzunova M, Turnev I, Ishpekova B, Herzegfalvi A, Simeonova I, Kalaydjieva L (2002) Spinal muscular atrophy among the Roma (Gypsies) in Bulgaria and Hungary. *Neuromuscul Disord* 12:378-385.
- Kalb RG (1994) Regulation of motor neuron dendrite growth by NMDA receptor activation. *Development* 120:3063-3071.
- Kalb RG, Hockfield S (1992) Activity-dependent development of spinal cord motor neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 17:283-289.
- Kalb RG, Hockfield S (1994) Electrical activity in the neuromuscular unit can influence the molecular development of motor neurons. *Dev Biol* 162:539-548.
- Kalb RG, Fox AJ (1997) Synchronized overproduction of AMPA, kainate, and NMDA glutamate receptors during human spinal cord development. *J Comp Neurol* 384:200-210.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (1995) *Essentials of neural science and behavior*:219-306.
- Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, Leykekhman O, Lutz C, Arkovitz MS, Landmesser LT, Monani UR (2008) Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 17:2552-2569.
- Kashima T, Manley JL (2003) A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 34:460-463.
- Kashima T, Rao N, Manley JL (2007) An intronic element contributes to splicing repression in spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3426-3431.
- Kaspar BK, Frost LM, Christian L, Umapathi P, Gage FH (2005) Synergy of insulin-like growth factor-1 and exercise in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57:649-655.
- Kato H, Faria TN, Stannard B, Roberts CT, Jr., LeRoith D (1993) Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3). *J Biol Chem* 268:2655-2661.
- Kato Z, Okuda M, Okumura Y, Arai T, Teramoto T, Nishimura M, Kaneko H, Kondo N (2009) Oral administration of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) analogue, taltireline hydrate, in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 24:1010-1012.
- Katz ME, McCormick F (1997) Signal transduction from multiple Ras effectors. *Curr Opin Genet Dev* 7:75-79.
- Kemp JA, McKernan RM (2002) NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci* 5 Suppl:1039-1042.
- Kennedy MB (1998) Signal transduction molecules at the glutamatergic postsynaptic membrane. *Brain Res Brain Res Rev* 26:243-257.
- Kernochan LE, Russo ML, Woodling NS, Huynh TN, Avila AM, Fischbeck KH, Sumner CJ (2005) The role of histone acetylation in SMN gene expression. *Hum Mol Genet* 14:1171-1182.
- Khatri IA, Chaudhry US, Seikaly MG, Browne RH, Iannaccone ST (2008) Low bone mineral density in spinal muscular atrophy. *J Clin Neuromuscul Dis* 10:11-17.
- Kinali M, Banks LM, Mercuri E, Manzur AY, Muntoni F (2004) Bone mineral density in a paediatric spinal muscular atrophy population. *Neuropediatrics* 35:325-328.
- Kinali M, Mercuri E, Main M, De Biasia F, Karatza A, Higgins R, Banks LM, Manzur AY, Muntoni F (2002) Pilot trial of albuterol in spinal muscular atrophy. *Neurology* 59:609-610.
- Kino-Québec (1999) quantité d'activité physique requise pour en retirer des bénéfices pour la santé. Avis du comité scientifique du secrétariat au loisir et au sport et ministère de la Santé et des Services sociaux, gouvernement du Québec.
- Kirkinezos IG, Hernandez D, Bradley WG, Moraes CT (2003) Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 53:804-807.
- Kirkwood A, Bear MF (1995) Elementary forms of synaptic plasticity in the visual cortex. *Biol Res* 28:73-80.
- Kirson ED, Schirra C, Konnerth A, Yaari Y (1999) Early postnatal switch in magnesium sensitivity of NMDA receptors in rat CA1 pyramidal cells. *J Physiol* 521 Pt 1:99-111.
- Kleyn PW, Wang CH, Lien LL, Vitale E, Pan J, Ross BM, Grunn A, Palmer DA, Warburton D, Brzustowicz LM, et al. (1993) Construction of a yeast artificial chromosome contig spanning the spinal muscular atrophy disease gene region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6801-6805.
- Klintsova AY, Cowell RM, Swain RA, Napper RM, Goodlett CR, Greenough WT (1998) Therapeutic effects of complex motor training on motor performance deficits induced by neonatal binge-like alcohol exposure in rats . I. Behavioral results. *Brain Res* 800:48-61.
- Ko HW, Park KY, Kim H, Han PL, Kim YU, Gwag BJ, Choi EJ (1998) Ca²⁺-mediated activation of c-Jun N-terminal kinase and nuclear factor kappa B by NMDA in cortical cell cultures. *J Neurochem* 71:1390-1395.
- Kohr G (2006) NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res* 326:439-446.
- Kolb SJ, Kissel JT (2011) Spinal muscular atrophy: a timely review. *Arch Neurol* 68:979-984.
- Kong L, Wang X, Choe DW, Polley M, Burnett BG, Bosch-Marce M, Griffin JW, Rich MM, Sumner CJ (2009) Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 29:842-851.
- König H, Ponta H, Herrlich P (1998) Coupling of signal transduction to alternative pre-mRNA splicing by a composite splice regulator. *EMBO J* 17:2904-2913.
- Koo SH, Flechner L, Qi L, Zhang X, Sreanor RA, Jeffries S, Hedrick S, Xu W, Boussovar F, Brindle P, Takemori H, Montminy M (2005) The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 437:1109-1111.
- Kooijman R (2006) Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:305-323.

- Korinthenberg R, Sauer M, Ketelsen UP, Hanemann CO, Stoll G, Graf M, Baborie A, Volk B, Wirth B, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K (1997) Congenital axonal neuropathy caused by deletions in the spinal muscular atrophy region. *Ann Neurol* 42:364-368.
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740.
- Krajewska G, Hausmanowa-Petrusewicz I (2002) Abnormal nerve conduction velocity as a marker of immaturity in childhood muscle spinal atrophy. *Folia Neuropathol* 40:67-74.
- Kramer AF, Erickson KI (2007) Capitalizing on cortical plasticity: influence of physical activity on cognition and brain function. *Trends Cogn Sci* 11:342-348.
- Kramer AF, Hahn S, Cohen NJ, Banich MT, McAuley E, Harrison CR, Chason J, Vakil E, Bardell L, Boileau RA, Colcombe A (1999) Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature* 400:418-419.
- Kramer JM, Plowey ED, Beatty JA, Little HR, Waldrop TG (2000) Hypothalamus, hypertension, and exercise. *Brain Res Bull* 53:77-85.
- Krapivinsky G, Krapivinsky L, Manasian Y, Ivanov A, Tyzio R, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Clapham DE, Medina I (2003) The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron* 40:775-784.
- Krauer KG, Buck M, Belzer DK, Flanagan J, Chojnowski GM, Sculley TB (2004) The Epstein-Barr virus nuclear antigen-6 protein co-localizes with EBNA-3 and survival of motor neurons protein. *Virology* 318:280-294.
- Krecic AM, Swanson MS (1999) hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* 11:363-371.
- Kugelberg E, Welander L (1954) Familial neurogenic (spinal) muscular atrophy simulating ordinary proximal dystrophy. *Acta psychiatr Scand* 29:42.
- Kugelberg E, Welander L (1956) Heredo familial juvenile muscular atrophy simulating muscular dystrophy. *Arch Neurol Psychiatr* 75:500-509.
- Kurihara N, Menaa C, Maeda H, Haile DJ, Reddy SV (2001) Osteoclast-stimulating factor interacts with the spinal muscular atrophy gene product to stimulate osteoclast formation. *J Biol Chem* 276:41035-41039.
- Kwon DY, Motley WW, Fischbeck KH, Burnett BG (2011) Increasing expression and decreasing degradation of SMN ameliorate the spinal muscular atrophy phenotype in mice. *Hum Mol Genet* 20:3667-3677.
- Labrum R, Rodda J, Krause A (2007) The molecular basis of spinal muscular atrophy (SMA) in South African black patients. *Neuromuscul Disord* 17:684-692.
- Lalani R, Bhasin S, Byhower F, Tarnuzzer R, Grant M, Shen R, Asa S, Ezzat S, Gonzalez-Cadavid NF (2000) Myostatin and insulin-like growth factor-I and -II expression in the muscle of rats exposed to the microgravity environment of the NeuroLab space shuttle flight. *J Endocrinol* 167:417-428.
- Lance-Jones C (1982) Motoneuron cell death in the developing lumbar spinal cord of the mouse. *Brain Res* 256:473-479.
- Larsen JO, Skalicky M, Viidik A (2000) Does long-term physical exercise counteract age-related Purkinje cell loss? A stereological study of rat cerebellum. *J Comp Neurol* 428:213-222.
- Latchman DS (1990) Cell-type-specific splicing factors and the regulation of alternative RNA splicing. *New Biol* 2:297-303.
- Laurie DJ, Seeburg PH (1994) Ligand affinities at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors depend on subunit composition. *Eur J Pharmacol* 268:335-345.
- Le TT, Coover DD, Monani UR, Morris GE, Burghes AH (2000) The survival motor neuron (SMN) protein: effect of exon loss and mutation on protein localization. *Neurogenetics* 3:7-16.
- Le TT, Pham LT, Butchbach ME, Zhang HL, Monani UR, Coover DD, Gavrilina TO, Xing L, Bassell GJ, Burghes AH (2005) SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum Mol Genet* 14:845-857.
- Lee B, Butcher GQ, Hoyt KR, Impey S, Obrietan K (2005) Activity-dependent neuroprotection and cAMP response element-binding protein (CREB): kinase coupling, stimulus intensity, and temporal regulation of CREB phosphorylation at serine 133. *J Neurosci* 25:1137-1148.
- Lee SJ, Campomanes CR, Sikat PT, Greenfield AT, Allen PB, McEwen BS (2004) Estrogen induces phosphorylation of cyclic AMP response element binding (pCREB) in primary hippocampal cells in a time-dependent manner. *Neuroscience* 124:549-560.
- Lee YI, Mikesch M, Smith I, Rimer M, Thompson W (2011) Muscles in a mouse model of spinal muscular atrophy show profound defects in neuromuscular development even in the absence of failure in neuromuscular transmission or loss of motor neurons. *Dev Biol* 356:432-444.
- Lefebvre S, Burlet P, Viollet L, Bertrand S, Huber C, Belser C, Munnich A (2002) A novel association of the SMN protein with two major non-ribosomal nucleolar proteins and its implication in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 11:1017-1027.
- Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, Dreyfuss G, Melki J (1997) Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 16:265-269.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80:155-165.
- Lesbordes JC, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, Joshi V, Bordet T, Kahn A, Melki J (2003) Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 12:1233-1239.
- Li Y, Brewer D, Burke RE, Ascoli GA (2005) Developmental changes in spinal motoneuron dendrites in neonatal mice. *J Comp Neurol* 483:304-317.
- Liang WC, Yuo CY, Chang JG, Chen YC, Chang YF, Wang HY, Ju YH, Chiou SS, Jong YJ (2008) The effect of hydroxyurea in spinal muscular atrophy cells and patients. *J Neurol Sci* 268:87-94.
- Liebetanz D, Hagemann K, von Lewinski F, Kahler E, Paulus W (2004) Extensive exercise is not harmful in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 20:3115-3120.
- Ling KK, Gibbs RM, Feng Z, Ko CP (2012) Severe neuromuscular denervation of clinically relevant muscles in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 21:185-195.
- Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG (1996) Suppression of apoptosis in

- mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379:349-353.
- Liu H, Shafey D, Moores JN, Kothary R (2010) Neurodevelopmental consequences of Smn depletion in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Neurosci Res* 88:111-122.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75:59-72.
- Liu Q, Dreyfuss G (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J* 15:3555-3565.
- Liu Q, Fischer U, Wang F, Dreyfuss G (1997) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* 90:1013-1021.
- Liu Y, Zhang J (2000) Recent development in NMDA receptors. *Chin Med J (Engl)* 113:948-956.
- Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyakkers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM, Wang YT (2007) NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27:2846-2857.
- Llado J, Caldero J, Ribera J, Tarabal O, Oppenheim RW, Esquerda JE (1999) Opposing effects of excitatory amino acids on chick embryo spinal cord motoneurons: excitotoxic degeneration or prevention of programmed cell death. *J Neurosci* 19:10803-10812.
- Llorens-Martin M, Torres-Aleman I, Trejo JL (2010) Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour. *Mol Cell Neurosci* 44:109-117.
- Locatelli D, d'Errico P, Capra S, Finardi A, Colciaghi F, Setola V, Terao M, Garattini E, Battaglia G (2012) Spinal muscular atrophy pathogenic mutations impair the axonogenic properties of axonal-survival of motor neuron. *J Neurochem* 121:465-474.
- Locatelli D, Terao M, Fratelli M, Zanetti A, Kurosaki M, Lupi M, Barzago MM, Uggetti A, Capra S, D'Errico P, Battaglia GS, Garattini E (2012) Human axonal survival of motor neuron (a-SMN) protein stimulates axon growth, cell motility, C-C motif ligand 2 (CCL2), and insulin-like growth factor-1 (IGF1) production. *J Biol Chem* 287:25782-25794.
- Lorson CL, Androphy EJ (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet* 9:259-265.
- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6307-6311.
- Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH, Androphy EJ (1998) SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet* 19:63-66.
- Lorson MA, Spate LD, Prather RS, Lorson C (2008) Identification and characterization of the porcine (*Sus scrofa*) survival motor neuron (SMN1) gene: an animal model for therapeutic studies. *Dev Dyn* 237:2268-2278.
- Lorson MA, Spate LD, Samuel MS, Murphy CN, Lorson CL, Prather RS, Wells KD (2011) Disruption of the Survival Motor Neuron (SMN) gene in pigs using ssDNA. *Transgenic Res* 20:1293-1304.
- Lowe WL (1991) Biologic actions of insulin-like growth factors. *CRC Press, Boca Raton*:49-85.
- Lu B, Czernik AJ, Popov S, Wang T, Poo MM, Greengard P (1996) Expression of synapsin I correlates with maturation of the neuromuscular synapse. *Neuroscience* 74:1087-1097.
- Lu X, Tang X, Guo W, Ren T, Zhao H (2010) Sorafenib induces growth inhibition and apoptosis of human chondrosarcoma cells by blocking the RAF/ERK/MEK pathway. *J Surg Oncol* 102:821-826.
- Lu Y, Zhang M, Lim IA, Hall DD, Allen M, Medvedeva Y, McKnight GS, Usachev YM, Hell JW (2008) AKAP150-anchored PKA activity is important for LTD during its induction phase. *J Physiol* 586:4155-4164.
- Lunetta C, Serafini M, Prella A, Magni P, Dozio E, Ruscica M, Sassone J, Colciago C, Moggio M, Corbo M, Silani V (2012) Impaired expression of insulin-like growth factor-1 system in skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Muscle Nerve* 45:200-208.
- Lunn JS, Sakowski SA, Kim B, Rosenberg AA, Feldman EL (2009) Vascular endothelial growth factor prevents G93A-SOD1-induced motor neuron degeneration. *Dev Neurobiol* 69:871-884.
- Lunn MR, Root DE, Martino AM, Flaherty SP, Kelley BP, Coover DD, Burghes AH, Man NT, Morris GE, Zhou J, Androphy EJ, Sumner CJ, Stockwell BR (2004) Indoprofen upregulates the survival motor neuron protein through a cyclooxygenase-independent mechanism. *Chem Biol* 11:1489-1493.
- Lupa MT, Hall ZW (1989) Progressive restriction of synaptic vesicle protein to the nerve terminal during development of the neuromuscular junction. *J Neurosci* 9:3937-3945.
- MacKenzie A (2010) Genetic therapy for spinal muscular atrophy. *Nat Biotechnol* 28:235-237.
- MacLeod MJ, Taylor JE, Lunt PW, Mathew CG, Robb SA (1999) Prenatal onset spinal muscular atrophy. *Eur J Paediatr Neurol* 3:65-72.
- Mahoney DJ, Rodriguez C, Devries M, Yasuda N, Tarnopolsky MA (2004) Effects of high-intensity endurance exercise training in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 29:656-662.
- Maier JK, Lahoua Z, Gendron NH, Fetni R, Johnston A, Davoodi J, Rasper D, Roy S, Slack RS, Nicholson DW, MacKenzie AE (2002) The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7. *J Neurosci* 22:2035-2043.
- Maiese K, Boniece IR, Skurat K, Wagner JA (1993) Protein kinases modulate the sensitivity of hippocampal neurons to nitric oxide toxicity and anoxia. *J Neurosci Res* 36:77-87.
- Mailman MD, Hemingway T, Darsey RL, Glasure CE, Huang Y, Chadwick RB, Heinz JW, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Schafer RW, Abuelo DN, Reich EW, Theil KS, Burghes AH, de la Chapelle A, Prior TW (2001) Hybrids monosomal for human chromosome 5 reveal the presence of a spinal muscular atrophy (SMA) carrier with two SMN1 copies on one chromosome. *Hum Genet* 108:109-115.
- Main M, Kairon H, Mercuri E, Muntoni F (2003) The Hammersmith functional motor scale for children with spinal muscular atrophy: a scale to test ability and monitor progress in children with limited ambulation. *Eur J Paediatr Neurol* 7:155-159.
- Majumdar D, Nebhan CA, Hu L, Anderson B, Webb DJ (2011) An APPL1/Akt signaling complex regulates dendritic spine and synapse formation in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 46:633-644.
- Majumder S, Varadharaj S, Ghoshal K, Monani U, Burghes AH, Jacob ST (2004) Identification of a novel cyclic AMP-

- response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene. *J Biol Chem* 279:14803-14811.
- Mamounas LA, Blue ME, Siuciak JA, Altar CA (1995) Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain. *J Neurosci* 15:7929-7939.
- Marini AM, Paul SM (1992) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection in cerebellar granule cells requires new RNA and protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6555-6559.
- Markowitz JA, Singh P, Darras BT (2012) Spinal muscular atrophy: a clinical and research update. *Pediatr Neurol* 46:1-12.
- Martin Y, Valero A, del Castillo E, Pascual SI, Hernandez-Chico C (2002) Genetic study of SMA patients without homozygous SMN1 deletions: identification of compound heterozygotes and characterisation of novel intragenic SMN1 mutations. *Hum Genet* 110:257-263.
- Martinez-Hernandez R, Soler-Botija C, Also E, Alias L, Caselles L, Gich I, Bernal S, Tizzano EF (2009) The developmental pattern of myotubes in spinal muscular atrophy indicates prenatal delay of muscle maturation. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:474-481.
- Matera AG (1999) Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol* 9:302-309.
- Mathews LS, Hammer RE, Brinster RL, Palmiter RD (1988) Expression of insulin-like growth factor I in transgenic mice with elevated levels of growth hormone is correlated with growth. *Endocrinology* 123:433-437.
- Matsuda K, Fletcher M, Kamiya Y, Yuzaki M (2003) Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *J Neurosci* 23:10064-10073.
- Matsuno M, Kose H, Okabe M, Hiromi Y (2007) TFIIF controls developmentally-regulated cell cycle progression as a holo complex. *Genes Cells* 12:1289-1300.
- Mattaj IW, De Robertis EM (1985) Nuclear segregation of U2 snRNA requires binding of specific snRNP proteins. *Cell* 40:111-118.
- Matter N, Herrlich P, Konig H (2002) Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* 420:691-695.
- McAndrew PE, Parsons DW, Simard LR, Rochette C, Ray PN, Mendell JR, Prior TW, Burghes AH (1997) Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. *Am J Hum Genet* 60:1411-1422.
- McCauley VM (1992) Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer* 65:311-320.
- McCrate ME, Kaspar BK (2008) Physical activity and neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromolecular Med* 10:108-117.
- McDonald JW, Johnston MV (1990) Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev* 15:41-70.
- McKenzie MJ, Goldfarb AH (2007) Aerobic exercise bout effects on gene transcription in the rat soleus. *Med Sci Sports Exerc* 39:1515-1521.
- McWhorter ML, Monani UR, Burghes AH, Beattie CE (2003) Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J Cell Biol* 162:919-931.
- Meister G, Fischer U (2002) Assisted RNP assembly: SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNPs. *EMBO J* 21:5853-5863.
- Meister G, Hannus S, Plottner O, Baars T, Hartmann E, Fakan S, Lagerbauer B, Fischer U (2001) SMNp is an essential pre-mRNA splicing factor required for the formation of the mature spliceosome. *EMBO J* 20:2304-2314.
- Melki J, Abdelhak S, Sheth P, Bachelot M, Burlet P, Marcadet A, Aicardi J, Barois A, Carriere J, Fardeau M (1990) Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 344:767-768.
- Melki J, Lefebvre S, Burglen L, Burlet P, Clermont O, Millasseau P, Reboullet S, Benichou B, Zeviani M, Le Paslier D, et al. (1994) De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. *Science* 264:1474-1477.
- Mentis GZ, Greensmith L, Vrbova G (1993) Motoneurons destined to die are rescued by blocking N-methyl-D-aspartate receptors by MK-801. *Neuroscience* 54:283-285.
- Mercer EA, Korhonen L, Skoglosa Y, Olsson PA, Kukkonen JP, Lindholm D (2000) NAIP interacts with hippocalcin and protects neurons against calcium-induced cell death through caspase-3-dependent and -independent pathways. *Embo J* 19:3597-3607.
- Mercuri E, Bertini E, Messina S, Pelliccioni M, D'Amico A, Colitto F, Mirabella M, Tiziano FD, Vitali T, Angelozzi C, Kinali M, Main M, Brahe C (2004) Pilot trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 14:130-135.
- Mercuri E et al. (2007) Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neurology* 68:51-55.
- Merlini L, Granata C, Bonfiglioli S, Marini ML, Cervellati S, Savini R (1989) Scoliosis in spinal muscular atrophy: natural history and management. *Dev Med Child Neurol* 31:501-508.
- Merlini L, Solari A, Vita G, Bertini E, Minetti C, Mongini T, Mazzoni E, Angelini C, Morandi L (2003) Role of gabapentin in spinal muscular atrophy: results of a multicenter, randomized Italian study. *J Child Neurol* 18:537-541.
- Meyer-Franke A, Wilkinson GA, Kruttgen A, Hu M, Munro E, Hanson MG, Jr., Reichardt LF, Barres BA (1998) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* 21:681-693.
- Miguel-Aliaga I, Chan YB, Davies KE, van den Heuvel M (2000) Disruption of SMN function by ectopic expression of the human SMN gene in Drosophila. *FEBS Lett* 486:99-102.
- Miguel-Aliaga I, Culetto E, Walker DS, Baylis HA, Sattelle DB, Davies KE (1999) The Caenorhabditis elegans orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability. *Hum Mol Genet* 8:2133-2143.
- Miller RG, Moore DH, Dronskey V, Bradley W, Barohn R, Bryan W, Prior TW, Gelinas DF, Iannaccone S, Kissel J, Leshner R, Mendell J, Mendoza M, Russman B, Samaha F, Smith S (2001) A placebo-controlled trial of gabapentin in spinal muscular atrophy. *J Neural Sci* 191:127-131.
- Millino C, Fanin M, Vettori A, Laveder P, Mostacciuolo ML, Angelini C, Lanfranchi G (2009) Different atrophy-hypertrophy transcription pathways in muscles affected by severe and mild spinal muscular atrophy. *BMC Med* 7:14.
- Miniou P, Tiziano D, Frugier T, Roblot N, Le Meur M, Melki J (1999) Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage. *Nucleic Acids Res* 27:e27.

- Monani UR (2005) Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron* 48:885-896.
- Monani UR, McPherson JD, Burghes AH (1999) Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). *Biochim Biophys Acta* 1445:330-336.
- Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 8:1177-1183.
- Monani UR, Sendtner M, Coovert DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossoll W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*(^{-/-}) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 9:333-339.
- Monsalve M, Wu Z, Adelmant G, Puigserver P, Fan M, Spiegelman BM (2000) Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell* 6:307-316.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-1221.
- Moosa A, Dubowitz V (1973) Spinal muscular atrophy in childhood. Two clues to clinical diagnosis. *Arch Dis Child* 48:386-388.
- Morioka M, Fukunaga K, Nagahiro S, Kurino M, Ushio Y, Miyamoto E (1995) Glutamate-induced loss of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 64:2132-2139.
- Morrison KE, Daniels RJ, Suthers GK, Flynn GA, Francis MJ, Buckle VJ, Davies KE (1992) High-resolution genetic map around the spinal muscular atrophy (SMA) locus on chromosome 5. *Am J Hum Genet* 50:520-527.
- Mostacciuolo ML, Danieli GA, Trevisan C, Muller E, Angelini C (1992) Epidemiology of spinal muscular atrophies in a sample of the Italian population. *Neuroepidemiology* 11:34-38.
- Muller B, Melki J, Burlet P, Clerget-Darpoux F (1992) Proximal spinal muscular atrophy (SMA) types II and III in the same sibship are not caused by different alleles at the SMA locus on 5q. *Am J Hum Genet* 50:892-895.
- Munsat T (1991) International SMA Collaboration. *Neuromuscul Disord* 1:81.
- Munsat TL, Woods R, Fowler W, Pearson CM (1969) Neurogenic muscular atrophy of infancy with prolonged survival. The variable course of Werdnig-Hoffmann Disease. *Brain* 92:9-24.
- Murdock M, Malgieri A, Luchetti A, Saieva L, Dobrowolny G, De Leonibus E, Filareto A, Quitadamo MC, Novelli G, Musaro A, Sanguolo F (2012) IPLEX Administration Improves Motor Neuron Survival and Ameliorates Motor Functions in a Severe Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *Mol Med* 18:1076-1085.
- Musaro A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, Barton ER, Sweeney HL, Rosenthal N (2001) Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet* 27:195-200.
- Mutsaers CA, Wishart TM, Lamont DJ, Riessland M, Schreml J, Comley LH, Murray LM, Parson SH, Lochmuller H, Wirth B, Talbot K, Gillingwater TH (2011) Reversible molecular pathology of skeletal muscle in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 20:4334-4344.
- Narayanan U, Ospina JK, Frey MR, Hebert MD, Matera AG (2002) SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin beta. *Hum Mol Genet* 11:1785-1795.
- Navarrete R, Vrbova G (1984) Differential effect of nerve injury at birth on the activity pattern of reinnervated slow and fast muscles of the rat. *J Physiol* 351:675-685.
- Nelson ML, Ismail MY, McIntyre L, Bhatia B, Viski P, Hawkins P, Rennie G, Andorsky D, Messersmith D, Stapleton K, Dumornay J, Sheahan P, Verma AK, Warchol T, Levy SB (2003) Versatile and facile synthesis of diverse semisynthetic tetracycline derivatives via Pd-catalyzed reactions. *J Org Chem* 68:5838-5851.
- Nicole S, Desforges B, Millet G, Lesbordes J, Cifuentes-Diaz C, Vertes D, Cao ML, De Backer F, Languille L, Rblot N, Joshi V, Gillis JM, Melki J (2003) Intact satellite cells lead to remarkable protection against *Smn* gene defect in differentiated skeletal muscle. *J Cell Biol* 161:571-582.
- Nijholt IM, Dolga AM, Ostroveanu A, Luiten PG, Schmidt M, Eisel UL (2008) Neuronal AKAP150 coordinates PKA and Epac-mediated PKB/Akt phosphorylation. *Cell Signal* 20:1715-1724.
- Nishi M, Hinds H, Lu HP, Kawata M, Hayashi Y (2001) Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci* 21:RC185.
- Nizzardo M, Nardini M, Ronchi D, Salani S, Donadoni C, Fortunato F, Colciago G, Falcone M, Simone C, Riboldi G, Govoni A, Bresolin N, Comi GP, Corti S (2011) Beta-lactam antibiotic offers neuroprotection in a spinal muscular atrophy model by multiple mechanisms. *Exp Neurol* 229:214-225.
- Noble SM, Guthrie C (1996) Transcriptional pulse-chase analysis reveals a role for a novel snRNP-associated protein in the manufacture of spliceosomal snRNPs. *Embo J* 15:4368-4379.
- Noble SM, Guthrie C (1996) Identification of novel genes required for yeast pre-mRNA splicing by means of cold-sensitive mutations. *Genetics* 143:67-80.
- Nolle A, Zeug A, van Bergeijk J, Tonges L, Gerhard R, Brinkmann H, Al Rayes S, Hensel N, Schill Y, Apkhazava D, Jablonka S, O'Mer J, Kumar Srivastav R, Baasner A, Lingor P, Wirth B, Ponimaskin E, Niedenthal R, Grothe C, Claus P (2011) The spinal muscular atrophy disease protein SMN is linked to the rho-kinase pathway via profilin. *Hum Mol Genet* 20:4865-4878.
- Nunez-Abades PA, He F, Barrionuevo G, Cameron WE (1994) Morphology of developing rat genioglossal motoneurons studied in vitro: changes in length, branching pattern, and spatial distribution of dendrites. *J Comp Neurol* 339:401-420.
- Nunez-Abades PA, Pattillo JM, Hodgson TM, Cameron WE (2000) Role of synaptic inputs in determining input resistance of developing brain stem motoneurons. *J Neurophysiol* 84:2317-2329.
- O'Connor RS, Mills ST, Jones KA, Ho SN, Pavlath GK (2007) A combinatorial role for NFAT5 in both myoblast migration and differentiation during skeletal muscle myogenesis. *J Cell Sci* 120:149-159.
- Ogawa C, Usui K, Aoki M, Ito F, Itoh M, Kai C, Kanamori-Katayama M, Hayashizaki Y, Suzuki H (2007) Gemin2 plays an important role in stabilizing the survival of motor neuron complex. *J Biol Chem* 282:11122-11134.

- Ogino S, Gao S, Leonard DG, Paessler M, Wilson RB (2003) Inverse correlation between SMN1 and SMN2 copy numbers: evidence for gene conversion from SMN2 to SMN1. *Eur J Hum Genet* 11:275-277.
- Olney JW (1990) Excitotoxin-mediated neuron death in youth and old age. *Prog Brain Res* 86:37-51.
- Olson EN, Williams RS (2000) Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell* 101:689-692.
- Oppenheim H (1900) Über allgemeine und localisierte Atonie der Muskulatur (Myatonie) im frühen Kindsalter. *Monatsschr Psychiatr Neurol* 8:232-233.
- Oppenheim RW (1986) The absence of significant postnatal motoneuron death in the brachial and lumbar spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 246:281-286.
- Oppenheim RW (1989) The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci* 12:252-255.
- Oppenheim RW, Chu-Wang IW, Maderdrut JL (1978) Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. III. The differentiation of motoneurons prior to their induced degeneration following limb-bud removal. *J Comp Neurol* 177:87-111.
- Oprea GE, Krober S, McWhorter ML, Rossoll W, Muller S, Krawczak M, Bassell GJ, Beattie CE, Wirth B (2008) Platin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science* 320:524-527.
- Owen N, Doe CL, Mellor J, Davies KE (2000) Characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* orthologue of the human survival motor neuron (SMN) protein. *Hum Mol Genet* 9:675-684.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581-618.
- Ozdinler PH, Macklis JD (2006) IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nat Neurosci* 9:1371-1381.
- Pagliardini S, Giavazzi A, Setola V, Lizier C, Di Luca M, DeBiasi S, Battaglia G (2000) Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord. *Hum Mol Genet* 9:47-56.
- Palecek JI, Abdrachmanova G, Vlachova V, Vycklick L, Jr. (1999) Properties of NMDA receptors in rat spinal cord motoneurons. *Eur J Neurosci* 11:827-836.
- Pang TY, Stam NC, Nithianantharajah J, Howard ML, Hannan AJ (2006) Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in Huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience* 141:569-584.
- Paoletti P, Neyton J (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7:39-47.
- Park HB, Lee SM, Lee JS, Park MS, Park KI, Namgung R, Lee C (2010) Survival analysis of spinal muscular atrophy type I. *Korean J Pediatr* 53:965-970.
- Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL, Patterson RJ (2001) Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic Acids Res* 29:3595-3602.
- Parsons DW, McAndrew PE, Monani UR, Mendell JR, Burghes AH, Prior TW (1996) An 11 base pair duplication in exon 6 of the SMN gene produces a type I spinal muscular atrophy (SMA) phenotype: further evidence for SMN as the primary SMA-determining gene. *Hum Mol Genet* 5:1727-1732.
- Parsons DW, McAndrew PE, Iannaccone ST, Mendell JR, Burghes AH, Prior TW (1998) Intragenic telSMN mutations: frequency, distribution, evidence of a founder effect, and modification of the spinal muscular atrophy phenotype by cenSMN copy number. *Am J Hum Genet* 63:1712-1723.
- Pascalet-Guidon MJ, Bois E, Feingold J, Mattei JF, Combes JC, Hamon C (1984) Cluster of acute infantile spinal muscular atrophy (Werdnig-Hoffmann disease) in a limited area of Reunion Island. *Clin Genet* 26:39-42.
- Passini MA, Bu J, Roskelley EM, Richards AM, Sardi SP, O'Riordan CR, Klinger KW, Shihabuddin LS, Cheng SH (2010) CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 120:1253-1264.
- Paushkin S, Gubitz AK, Massenet S, Dreyfuss G (2002) The SMN complex, an assemblysome of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* 14:305-312.
- Paushkin S, Charroux B, Abel L, Perkinson RA, Pellizzoni L, Dreyfuss G (2000) The survival motor neuron protein of *Schizosaccharomyces pombe*. Conservation of survival motor neuron interaction domains in divergent organisms. *J Biol Chem* 275:23841-23846.
- Pearn J (1973) The gene frequency of acute Werdnig-Hoffmann disease (SMA type I). A total population survey in North-east England. *J Med Genet* 10:260-265.
- Pearn J (1978) Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 15:409-413.
- Pearn J, Bundley S, Carter CO, Wilson J, Gardner-Medwin D, Walton JN (1978) A genetic study of subacute and chronic spinal muscular atrophy in childhood. A nosological analysis of 124 index patients. *J Neurol Sci* 37:227-248.
- Pearn JH, Carter CO, Wilson J (1973) The genetic identity of acute infantile spinal muscular atrophy. *Brain* 96:463-470.
- Pedrotti S, Bielli P, Paronetto MP, Ciccocanti F, Fimia GM, Stamm S, Manley JL, Sette C (2010) The splicing regulator Sam68 binds to a novel exonic splicing silencer and functions in SMN2 alternative splicing in spinal muscular atrophy. *EMBO J* 29:1235-1247.
- Pellizzoni L (2007) Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep* 8:340-345.
- Pellizzoni L, Charroux B, Dreyfuss G (1999) SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11167-11172.
- Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G (1998) A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* 95:615-624.
- Pellizzoni L, Baccon J, Charroux B, Dreyfuss G (2001) The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr Biol* 11:1079-1088.
- Pellizzoni L, Charroux B, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2001) A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II. *J Cell Biol* 152:75-85.
- Pellizzoni L, Baccon J, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2002) Purification of native survival of motor neurons complexes and identification of Gemin6 as a novel component. *J Biol Chem* 277:7540-7545.
- Pennica D, Arce V, Swanson TA, Vejsada R, Pollock RA, Armanini M, Dudley K, Phillips HS, Rosenthal A, Kato AC, Henderson CE (1996) Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. *Neuron* 17:63-74.
- Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF (2001) Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of

- NR3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci* 21:1228-1237.
- Perrier JF, Hounsgaard J (2000) Development and regulation of response properties in spinal cord motoneurons. *Brain Res Bull* 53:529-535.
- Perry J (1983) Rehabilitation of the neurologically disabled patient: principles, practice, and scientific basis. *J Neurosurg* 58:799-816.
- Petit F, Cuisset JM, Rouaix-Emery N, Cances C, Sablonniere B, Bieth E, Moerman A, Sukno S, Hardy N, Holder-Espinasse M, Manouvrier-Hanu S, Vallee L (2011) Insights into genotype-phenotype correlations in spinal muscular atrophy: a retrospective study of 103 patients. *Muscle Nerve* 43:26-30.
- Pette D, Staron RS (1997) Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol* 170:143-223.
- Platani M, Goldberg I, Lamond AI, Swedlow JR (2002) Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent. *Nat Cell Biol* 4:502-508.
- Porensky PN, Mitrapant C, McGovern VL, Bevan AK, Foust KD, Kaspar BK, Wilton SD, Burghes AH (2012) A single administration of morpholino antisense oligomer rescues spinal muscular atrophy in mouse. *Hum Mol Genet* 21:1625-1638.
- Prior TW, Krainer AR, Hua Y, Swoboda KJ, Snyder PC, Bridgeman SJ, Burghes AH, Kissel JT (2009) A positive modifier of spinal muscular atrophy in the SMN2 gene. *Am J Hum Genet* 85:408-413.
- Pruss RM, Giraudon-Paoli M, Morozova S, Berna P, Abitbol JL, Bordet T (2010) Drug discovery and development for spinal muscular atrophy: lessons from screening approaches and future challenges for clinical development. *Future Med Chem* 2:1429-1440.
- Purves D (1980) Neuronal competition. *Nature* 287:585-586.
- Rajendra TK, Gonsalvez GB, Walker MP, Shpargel KB, Salz HK, Matera AG (2007) A *Drosophila melanogaster* model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle. *J Cell Biol* 176:831-841.
- Ramirez V, Ulfhake B (1991) Postnatal development of cat hind limb motoneurons supplying the intrinsic muscles of the foot sole. *Brain Res Dev Brain Res* 62:189-202.
- Ramón y Cajal S (1903) Un sencillo método de coloración selectiva del retículo protoplasmico. *Invest Biol* 2:129-221.
- Reddy R (1988) Compilation of small RNA sequences. *Nucleic Acids Res* 16 Suppl:r71-85.
- Relaix F, Marcelle C (2009) Muscle stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 21:748-753.
- Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD (1999) Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286:2358-2361.
- Riessland M, Brichta L, Hahnen E, Wirth B (2006) The benzamide M344, a novel histone deacetylase inhibitor, significantly increases SMN2 RNA/protein levels in spinal muscular atrophy cells. *Hum Genet* 120:101-110.
- Riessland M, Ackermann B, Forster A, Jakubik M, Hauke J, Garbes L, Fritzsche I, Mende Y, Blumcke I, Hahnen E, Wirth B (2010) SAHA ameliorates the SMA phenotype in two mouse models for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 19:1492-1506.
- Rochette CF, Gilbert N, Simard LR (2001) SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to *Homo sapiens*. *Hum Genet* 108:255-266.
- Rochette CF, Surh LC, Ray PN, McAndrew PE, Prior TW, Burghes AH, Vanasse M, Simard LR (1997) Molecular diagnosis of non-deletion SMA patients using quantitative PCR of SMN exon 7. *Neurogenetics* 1:141-147.
- Rodillo E, Marini ML, Heckmatt JZ, Dubowitz V (1989) Scoliosis in spinal muscular atrophy: review of 63 cases. *J Child Neurol* 4:118-123.
- Rodrigues NR, Campbell L, Owen N, Rodeck CH, Davies KE (1995) Prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy by gene deletion analysis. *Lancet* 345:1049.
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, Das P, Waterfield MD, Ridley A, Downward J (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 89:457-467.
- Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nunez L, Rossman R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD, Glass DJ (1999) Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 286:1738-1741.
- Rossoll W, Bassell GJ (2009) Spinal muscular atrophy and a model for survival of motor neuron protein function in axonal ribonucleoprotein complexes. *Results Probl Cell Differ* 48:289-326.
- Rossoll W, Kroning AK, Ohndorf UM, Steegborn C, Jablonka S, Sendtner M (2002) Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum Mol Genet* 11:93-105.
- Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M (2003) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 163:801-812.
- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB (2005) Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433:73-77.
- Rouget R, Vigneault F, Codio C, Rochette C, Paradis I, Drouin R, Simard LR (2005) Characterization of the survival motor neuron (SMN) promoter provides evidence for complex combinatorial regulation in undifferentiated and differentiated P19 cells. *Biochem J* 385:433-443.
- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X, et al. (1995) The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 80:167-178.
- Rudnik-Schoneborn S, Rohrig D, Morgan G, Wirth B, Zerres K (1994) Autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy in 101 sibs out of 48 families: clinical picture, influence of gender, and genetic implications. *Am J Med Genet* 51:70-76.
- Rudnik-Schoneborn S, Heller R, Berg C, Betzler C, Grimm T, Eggermann T, Eggermann K, Wirth R, Wirth B, Zerres K (2008) Congenital heart disease is a feature of severe infantile spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 45:635-638.
- Ruggiu M, McGovern VL, Lotti F, Saieva L, Li DK, Kariya S, Monani UR, Burghes AH, Pellizzoni L (2012) A Role for SMN Exon 7 Splicing in the Selective Vulnerability of Motor Neurons in Spinal Muscular Atrophy. *Mol Cell Biol* 32:126-138.
- Ruiz R, Casanas JJ, Torres-Benito L, Cano R, Tabares L (2010) Altered intracellular Ca²⁺ homeostasis in nerve terminals of severe spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 30:849-857.

- Russman BS, Iannaccone ST, Samaha FJ (2003) A phase 1 trial of riluzole in spinal muscular atrophy. *Arch Neurol* 60:1601-1603.
- Ryan MM (2008) The use of invasive ventilation is appropriate in children with genetically proven spinal muscular atrophy type 1: the motion against. *Paediatr Respir Rev* 9:51-54; discussion 55-56.
- Salpeter MM, Loring RH (1985) Nicotinic acetylcholine receptors in vertebrate muscle: properties, distribution and neural control. *Prog Neurobiol* 25:297-325.
- Samaha FJ, Buncher CR, Russman BS, White ML, Iannaccone ST, Barker L, Burhans K, Smith C, Perkins B, Zimmerman L (1994) Pulmonary function in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 9:326-329.
- Sara VR, Hall K (1990) Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* 70:591-614.
- Sasaoka T, Ishihara H, Sawa T, Ishiki M, Morioka H, Imamura T, Usui I, Takata Y, Kobayashi M (1996) Functional importance of amino-terminal domain of Shc for interaction with insulin and epidermal growth factor receptors in phosphorylation-independent manner. *J Biol Chem* 271:20082-20087.
- Scharf JM, Endrizzi MG, Wetter A, Huang S, Thompson TG, Zerres K, Dietrich WF, Wirth B, Kunkel LM (1998) Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nat Genet* 20:83-86.
- Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, Vianello M, Gundersen K, Lomo T (1989) Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 10:197-205.
- Schlett K, Pieri I, Metzger F, Marchetti L, Steigerwald F, Dere E, Kirilly D, Tarnok K, Barabas B, Varga AK, Gerspach J, Huston J, Pfizenmaier K, Kohr G, Eisel UL (2004) Long-term NR2B expression in the cerebellum alters granule cell development and leads to NR2A down-regulation and motor deficits. *Mol Cell Neurosci* 27:215-226.
- Schrank B, Gotz R, Gunnarsen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, Sendtner M (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9920-9925.
- Screaton RA, Konkright MD, Katoh Y, Best JL, Canettieri G, Jeffries S, Guzman E, Niessen S, Yates JR, 3rd, Takemori H, Okamoto M, Montminy M (2004) The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell* 119:61-74.
- Seebach BS, Mendell LM (1996) Maturation in properties of motoneurons and their segmental input in the neonatal rat. *J Neurophysiol* 76:3875-3885.
- Setola V, Terao M, Locatelli D, Bassanini S, Garattini E, Battaglia G (2007) Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1959-1964.
- Shababi M, Habibi J, Yang HT, Vale SM, Sewell WA, Lorson CL (2010) Cardiac defects contribute to the pathology of spinal muscular atrophy models. *Hum Mol Genet* 19:4059-4071.
- Shafey D, Cote PD, Kothary R (2005) Hypomorphic Smn knockdown C2C12 myoblasts reveal intrinsic defects in myoblast fusion and myotube morphology. *Exp Cell Res* 311:49-61.
- Shanmugarajan S, Tsuruga E, Swoboda KJ, Maria BL, Ries WL, Reddy SV (2009) Bone loss in survival motor neuron (Smn^{-/-}) SMN2) genetic mouse model of spinal muscular atrophy. *J Pathol* 219:52-60.
- Sheng M, Kim MJ (2002) Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 298:776-780.
- Sheth P, Abdelhak S, Bachelot MF, Burlet P, Masset M, Hillaire D, Clerget-Darpoux F, Frezal J, Lathrop GM, Munnich A, et al. (1991) Linkage analysis in spinal muscular atrophy, by six closely flanking markers on chromosome 5. *Am J Hum Genet* 48:764-768.
- Shyu AB, Wilkinson MF (2000) The double lives of shuttling mRNA binding proteins. *Cell* 102:135-138.
- Siegelbaum SA, Trautmann A, Koenig J (1984) Single acetylcholine-activated channel currents in developing muscle cells. *Dev Biol* 104:366-379.
- Simic G, Mladinov M, Seso Simic D, Jovanov Milosevic N, Islam A, Pajtak A, Barisic N, Sertic J, Lucassen PJ, Hof PR, Kruslin B (2008) Abnormal motoneuron migration, differentiation, and axon outgrowth in spinal muscular atrophy. *Acta Neuropathol* 115:313-326.
- Singh NN, Androphy EJ, Singh RN (2004) In vivo selection reveals combinatorial controls that define a critical exon in the spinal muscular atrophy genes. *RNA* 10:1291-1305.
- Singh NN, Androphy EJ, Singh RN (2004) An extended inhibitory context causes skipping of exon 7 of SMN2 in spinal muscular atrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 315:381-388.
- Singh NN, Shishimorova M, Cao LC, Gangwani L, Singh RN (2009) A short antisense oligonucleotide masking a unique intronic motif prevents skipping of a critical exon in spinal muscular atrophy. *RNA Biol* 6:341-350.
- Sinor JD, Du S, Venneti S, Blitzblau RC, Leszkiewicz DN, Rosenberg PA, Aizenman E (2000) NMDA and glutamate evoke excitotoxicity at distinct cellular locations in rat cortical neurons in vitro. *J Neurosci* 20:8831-8837.
- Skordis LA, Duncley MG, Yue B, Eperon IC, Muntoni F (2003) Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4114-4119.
- Skordis LA, Duncley MG, Burglen L, Campbell L, Talbot K, Patel S, Melki J, Davies KE, Dubowitz V, Muntoni F (2001) Characterisation of novel point mutations in the survival motor neuron gene SMN, in three patients with SMA. *Hum Genet* 108:356-357.
- Slater CR (1982) Neural influence on the postnatal changes in acetylcholine receptor distribution at nerve-muscle junctions in the mouse. *Dev Biol* 94:23-30.
- Soler-Botija C, Ferrer I, Gich I, Baiget M, Tizzano EF (2002) Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord. *Brain* 125:1624-1634.
- Soler-Botija C, Cusco I, Caselles L, Lopez E, Baiget M, Tizzano EF (2005) Implication of fetal SMN2 expression in type I SMA pathogenesis: protection or pathological gain of function? *J Neuropathol Exp Neurol* 64:215-223.
- Somers E, Stencel Z, Wishart TM, Gillingwater TH, Parson SH (2011) Density, calibre and ramification of muscle capillaries are altered in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord*.
- Somerville MJ, Hunter AG, Aubry HL, Korneluk RG, MacKenzie AE, Surh LC (1997) Clinical application of the molecular diagnosis of spinal muscular atrophy: deletions of neuronal apoptosis inhibitor protein and survival motor neuron genes. *Am J Med Genet* 69:159-165.
- Sossi V, Giuli A, Vitali T, Tiziano F, Mirabella M, Antonelli A, Neri G, Brahe C (2001) Premature termination mutations in exon 3 of the SMN1 gene are associated with exon

- skipping and a relatively mild SMA phenotype. *Eur J Hum Genet* 9:113-120.
- Souchon F, Simard LR, Lebrun S, Rochette C, Lambert J, Vanasse M (1996) Clinical and genetic study of chronic (types II and III) childhood onset spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 6:419-424.
- Spiegel R, Hagmann A, Boltshauser E, Moser H (1996) [Molecular genetic diagnosis and deletion analysis in Type I-III spinal muscular atrophy]. *Schweiz Med Wochenschr* 126:907-914.
- Spiro A (1970) Minipolymyoclonus, A neglected sign in childhood spinal muscular atrophy. *Neurology* 20.
- Steigerwald F, Schulz TW, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH, Kohr G (2000) C-Terminal truncation of NR2A subunits impairs synaptic but not extrasynaptic localization of NMDA receptors. *J Neurosci* 20:4573-4581.
- Steinbach JH (1981) Neuromuscular junctions and alpha-bungarotoxin-binding sites in denervated and contralateral cat skeletal muscles. *J Physiol* 313:513-528.
- Steinberg MH (1997) Determinants of fetal hemoglobin response to hydroxyurea. *Semin Hematol* 34:8-14.
- Steinmetz EJ (1997) Pre-mRNA processing and the CTD of RNA polymerase II: the tail that wags the dog? *Cell* 89:491-494.
- Stevens G, Yawitch T, Rodda J, Verhaart S, Krause A (1999) Different molecular basis for spinal muscular atrophy in South African black patients. *Am J Med Genet* 86:420-426.
- Stevens L, Bastide B, Maurage CA, Dupont E, Montel V, Cieniewski-Bernard C, Cuisset JM, Vallee L, Mounier Y (2008) Childhood spinal muscular atrophy induces alterations in contractile and regulatory protein isoform expressions. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34:659-670.
- Stevens MR (1999) Hydroxyurea: an overview. *J Biol Regul Homeost Agents* 13:172-175.
- Stockdale FE, Miller JB (1987) The cellular basis of myosin heavy chain isoform expression during development of avian skeletal muscles. *Dev Biol* 123:1-9.
- Strack S, Colbran RJ (1998) Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 273:20689-20692.
- Strasswimmer J, Lorson CL, Breiding DE, Chen JJ, Le T, Burghes AH, Androphy EJ (1999) Identification of survival motor neuron as a transcriptional activator-binding protein. *Hum Mol Genet* 8:1219-1226.
- Stuart GJ, Hausser M (2001) Dendritic coincidence detection of EPSPs and action potentials. *Nat Neurosci* 4:63-71.
- Stummer W, Baethmann A, Murr R, Schurer L, Kempinski OS (1995) Cerebral protection against ischemia by locomotor activity in gerbils. Underlying mechanisms. *Stroke* 26:1423-1429; discussion 1430.
- Su YN, Hung CC, Lin SY, Chen FY, Chern JP, Tsai C, Chang TS, Yang CC, Li H, Ho HN, Lee CN (2011) Carrier screening for spinal muscular atrophy (SMA) in 107,611 pregnant women during the period 2005-2009: a prospective population-based cohort study. *PLoS One* 6:e17067.
- Subramaniam S, Shahani N, Strelau J, Laliberte C, Brandt R, Kaplan D, Unsicker K (2005) Insulin-like growth factor 1 inhibits extracellular signal-regulated kinase to promote neuronal survival via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase A/c-Raf pathway. *J Neurosci* 25:2838-2852.
- Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG, Lipton SA (1995) Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci* 15:6509-6520.
- Sugarman EA, Nagan N, Zhu H, Akmaev VR, Zhou Z, Rohlfis EM, Flynn K, Hendrickson BC, Scholl T, Sirko-Osadsa DA, Allitto BA (2012) Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72 400 specimens. *Eur J Hum Genet* 20:27-32.
- Sumner CJ (2007) Molecular mechanisms of spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 22:979-989.
- Sumner CJ, Huynh TN, Markowitz JA, Perhac JS, Hill B, Coover DD, Schussler K, Chen X, Jarecki J, Burghes AH, Taylor JP, Fischbeck KH (2003) Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann Neurol* 54:647-654.
- Sutton G, Chandler LJ (2002) Activity-dependent NMDA receptor-mediated activation of protein kinase B/Akt in cortical neuronal cultures. *J Neurochem* 82:1097-1105.
- Swoboda KJ, Kissel JT, Crawford TO, Bromberg MB, Acsadi G, D'Anjou G, Krosschell KJ, Reyna SP, Schroth MK, Scott CB, Simard LR (2007) Perspectives on clinical trials in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 22:957-966.
- Swoboda KJ, Scott CB, Reyna SP, Prior TW, LaSalle B, Sorenson SL, Wood J, Acsadi G, Crawford TO, Kissel JT, Krosschell KJ, D'Anjou G, Bromberg MB, Schroth MK, Chan GM, Elsheikh B, Simard LR (2009) Phase II open label study of valproic acid in spinal muscular atrophy. *PLoS One* 4:e5268.
- Swoboda KJ, Scott CB, Crawford TO, Simard LR, Reyna SP, Krosschell KJ, Acsadi G, Elsheikh B, Schroth MK, D'Anjou G, LaSalle B, Prior TW, Sorenson SL, Maczulski JA, Bromberg MB, Chan GM, Kissel JT (2010) SMA CARNI-VAL trial part I: double-blind, randomized, placebo-controlled trial of L-carnitine and valproic acid in spinal muscular atrophy. *PLoS One* 5:e12140.
- Takeuchi Y, Miyamoto Y, Komatsu H, Oomizono Y, Nishimura A, Okano S, Nishiki T, Sawada T (1994) Efficacy of thyrotropin-releasing hormone in the treatment of spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 9:287-289.
- Talbot K, Ponting CP, Theodosiou AM, Rodrigues NR, Surtees R, Mountford R, Davies KE (1997) Missense mutation clustering in the survival motor neuron gene: a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism? *Hum Mol Genet* 6:497-500.
- Tanaka Y, Tamoto H, Tozuka Z, Sato A, Kimura T (1999) Metabolism and degradation products of recombinant human insulin-like growth factor-I in lysosomes of rat kidney. *Xenobiotica* 29:281-295.
- Tangsrud S, Halvorsen S (1988) Child neuromuscular disease in Southern Norway. Prevalence, age and distribution of diagnosis with special reference to non Duchenne muscular dystrophy. *Clin Genet* 34:145-152.
- Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME (1998) Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20:709-726.
- Taylor CP (1997) Mechanisms of action of gabapentin. *Rev Neurol (Paris)* 153 Suppl 1:S39-45.
- Taylor JE, Thomas NH, Lewis CM, Abbs SJ, Rodrigues NR, Davies KE, Mathew CG (1998) Correlation of SMN1 and SMN2 gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 6:467-474.

- Tein I, Sloane AE, Donner EJ, Lehotay DC, Millington DS, Kelley RI (1995) Fatty acid oxidation abnormalities in childhood-onset spinal muscular atrophy: primary or secondary defect(s)? *Pediatr Neurol* 12:21-30.
- Thalhammer A, Rudhard Y, Tigaret CM, Volynski KE, Rusakov DA, Schoepfer R (2006) CaMKII translocation requires local NMDA receptor-mediated Ca²⁺ signaling. *EMBO J* 25:5873-5883.
- Thompson TG, DiDonato CJ, Simard LR, Ingraham SE, Burghes AH, Crawford TO, Rochette C, Mendell JR, Wasmuth JJ (1995) A novel cDNA detects homozygous microdeletions in greater than 50% of type I spinal muscular atrophy patients. *Nat Genet* 9:56-62.
- Thurmond J, Butchbach ME, Palomo M, Pease B, Rao M, Bedell L, Keyvan M, Pai G, Mishra R, Haraldsson M, Andresson T, Bragason G, Thosteinsdottir M, Bjornsson JM, Coovet DD, Burghes AH, Gurney ME, Singh J (2008) Synthesis and biological evaluation of novel 2,4-diaminoquinazoline derivatives as SMN2 promoter activators for the potential treatment of spinal muscular atrophy. *J Med Chem* 51:449-469.
- Tiziano FD et al. (2007) The Hammersmith functional score correlates with the SMN2 copy number: a multicentric study. *Neuromuscul Disord* 17:400-403.
- Tizzano EF, Cabot C, Baiget M (1998) Cell-specific survival motor neuron gene expression during human development of the central nervous system: implications for the pathogenesis of spinal muscular atrophy. *Am J Pathol* 153:355-361.
- Torres-Benito L, Ruiz R, Tabares L (2012) Synaptic defects in spinal muscular atrophy animal models. *Dev Neurobiol* 72:126-133.
- Torres Aleman I (2005) Role of insulin-like growth factors in neuronal plasticity and neuroprotection. *Adv Exp Med Biol* 567:243-258.
- Towbin H, Schoenenberger C, Ball R, Braun DG, Rosenfelder G (1984) Glycosphingolipid-blotting: an immunological detection procedure after separation by thin layer chromatography. *J Immunol Methods* 72:471-479.
- Trejo JL, Llorens-Martin MV, Torres-Aleman I (2008) The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* 37:402-411.
- Trulzsch B, Davies K, Wood M (2004) Survival of motor neuron gene downregulation by RNAi: towards a cell culture model of spinal muscular atrophy. *Brain Res Mol Brain Res* 120:145-150.
- Trulzsch B, Garnett C, Davies K, Wood M (2007) Knockdown of SMN by RNA interference induces apoptosis in differentiated P19 neural stem cells. *Brain Res* 1183:1-9.
- Tsai LK, Tsai MS, Lin TB, Hwu WL, Li H (2006) Establishing a standardized therapeutic testing protocol for spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* 24:286-295.
- Tsai MS, Chiu YT, Wang SH, Hsieh-Li HM, Li H (2006) Abolishing Trp53-dependent apoptosis does not benefit spinal muscular atrophy model mice. *Eur J Hum Genet* 14:372-375.
- Tsen G, Halfter W, Kroger S, Cole GJ (1995) Agrin is a heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 270:3392-3399.
- Tseng YH, Ueki K, Kriauciunas KM, Kahn CR (2002) Differential roles of insulin receptor substrates in the anti-apoptotic function of insulin-like growth factor-1 and insulin. *J Biol Chem* 277:31601-31611.
- Tzeng AC, Cheng J, Fryczynski H, Niranjana V, Stitik T, Sial A, Takeuchi Y, Foye P, DePrince M, Bach JR (2000) A study of thyrotropin-releasing hormone for the treatment of spinal muscular atrophy: a preliminary report. *Am J Phys Med Rehabil* 79:435-440.
- Ueda Y, Hirai S, Osada S, Suzuki A, Mizuno K, Ohno S (1996) Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem* 271:23512-23519.
- Uren AG, Coulson EJ, Vaux DL (1998) Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends Biochem Sci* 23:159-162.
- Valori CF, Ning K, Wyles M, Mead RJ, Grierson AJ, Shaw PJ, Azzouz M (2010) Systemic delivery of scAAV9 expressing SMN prolongs survival in a model of spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med* 2:35ra42.
- van Baak MA, Mayer LH, Kempinski RE, Hartgens F (2000) Effect of salbutamol on muscle strength and endurance performance in nonasthmatic men. *Med Sci Sports Exerc* 32:1300-1306.
- van Bergeijk J, Rydel-Konecke K, Grothe C, Claus P (2007) The spinal muscular atrophy gene product regulates neurite outgrowth: importance of the C terminus. *FASEB J* 21:1492-1502.
- van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP (2006) Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog Neurobiol* 79:205-221.
- van der Houven van Oordt W, Diaz-Meco MT, Lozano J, Krainer AR, Moscat J, Caceres JF (2000) The MKK3/6-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *J Cell Biol* 149:307-316.
- van der Steege G, Grootsholten PM, Cobben JM, Zappata S, Scheffer H, den Dunnen JT, van Ommen GJ, Brahe C, Buys CH (1996) Apparent gene conversions involving the SMN gene in the region of the spinal muscular atrophy locus on chromosome 5. *Am J Hum Genet* 59:834-838.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266-270.
- Velasco E, Valero C, Valero A, Moreno F, Hernandez-Chico C (1996) Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of cBCD541 and SMA phenotype. *Hum Mol Genet* 5:257-263.
- Veldink JH, Bar PR, Joosten EA, Otten M, Wokke JH, van den Berg LH (2003) Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscul Disord* 13:737-743.
- Viana F, Bayliss DA, Berger AJ (1994) Postnatal changes in rat hypoglossal motoneuron membrane properties. *Neuroscience* 59:131-148.
- Vinay L, Brocard F, Clarac F (2000) Differential maturation of motoneurons innervating ankle flexor and extensor muscles in the neonatal rat. *Eur J Neurosci* 12:4562-4566.
- Vinay L, Brocard F, Pflieger JF, Simeoni-Alias J, Clarac F (2000) Perinatal development of lumbar motoneurons and their inputs in the rat. *Brain Res Bull* 53:635-647.
- Vissel B, Krupp JJ, Heinemann SF, Westbrook GL (2001) A use-dependent tyrosine dephosphorylation of NMDA receptors is independent of ion flux. *Nat Neurosci* 4:587-596.
- Vitte JM, Davoult B, Roblot N, Mayer M, Joshi V, Courageot S, Tronche F, Vadrot J, Moreau MH, Kemeny F, Melki J (2004) Deletion of murine Smn exon 7 directed to liver leads to severe defect of liver development associated with iron overload. *Am J Pathol* 165:1731-1741.

- von Gise A, Lorenz P, Wellbrock C, Hemmings B, Berberich-Siebelt F, Rapp UR, Troppmair J (2001) Apoptosis suppression by Raf-1 and MEK1 requires MEK- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signals. *Mol Cell Biol* 21:2324-2336.
- Vrbova G, Fisher TJ (1989) The Effect of Inhibiting the Calcium Activated Neutral Protease, on Motor Unit Size after Partial Denervation of the Rat Soleus Muscle. *Eur J Neurosci* 1:616-625.
- Vult von Steyern F, Lomo T (2005) Postnatal appearance of 5-HT_{2A} receptors on fast flexor and slow extensor rat motor neurons. *Neuroscience* 136:87-93.
- Walker MP, Rajendra TK, Saieva L, Fuentes JL, Pellizzoni L, Matera AG (2008) SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disc and is a proteolytic target of calpain. *Hum Mol Genet* 17:3399-3410.
- Wan L, Battle DJ, Yong J, Gubitz AK, Kolb SJ, Wang J, Dreyfuss G (2005) The survival of motor neurons protein determines the capacity for snRNP assembly: biochemical deficiency in spinal muscular atrophy. *Mol Cell Biol* 25:5543-5551.
- Wang CH, Grzeschik SM, Madhuri G (2006) A phase I/II Clinical trial of hydroxyurea in type II and severe type III SMA. In: 10th International Spinal Muscular Atrophy Research Group Meeting; Montreal, Canada; 10-12 June 2006. Libertyville. *Families of Spinal Muscular Atrophy*:8.
- Wang CH, Papendick BD, Bruinsma P, Day JK (1998) Identification of a novel missense mutation of the SMN(T) gene in two siblings with spinal muscular atrophy. *Neurogenetics* 1:273-276.
- Watanabe M, Mishina M, Inoue Y (1994) Distinct spatiotemporal distributions of the N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the mouse cervical cord. *J Comp Neurol* 345:314-319.
- Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M (1992) Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3:1138-1140.
- Waxman EA, Lynch DR (2005) N-methyl-D-aspartate receptor subtype mediated bidirectional control of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 280:29322-29333.
- Wehl CC, Connolly AM, Pestronk A (2006) Valproate may improve strength and function in patients with type III/IV spinal muscle atrophy. *Neurology* 67:500-501.
- Wen HL, Lin YT, Ting CH, Lin-Chao S, Li H, Hsieh-Li HM (2010) Stathmin, a microtubule-destabilizing protein, is dysregulated in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 19:1766-1778.
- Werdnig G (1891) Two early infantile hereditary cases of progressive muscular atrophy simulating dystrophy, but on a neural basis. *Arch psychiatr* 22:437-481.
- Wernig A, Muller S, Nanassy A, Cagol E (1995) Laufband therapy based on 'rules of spinal locomotion' is effective in spinal cord injured persons. *Eur J Neurosci* 7:823-829.
- Weroha SJ, Haluska P (2008) IGF-1 receptor inhibitors in clinical trials—early lessons. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13:471-483.
- Westerga J, Gramsbergen A (1990) The development of locomotion in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 57:163-174.
- Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ (1995) Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* 269:403-407.
- Wilczak N, de Vos RA, De Keyser J (2003) Free insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins 2, 5, and 6 in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 361:1007-1011.
- Will CL, Luhrmann R (2001) Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 13:290-301.
- Williams BY, Hamilton SL, Sarkar HK (2000) The survival motor neuron protein interacts with the transactivator FUSE binding protein from human fetal brain. *FEBS Lett* 470:207-210.
- Winsor EJ, Murphy EG, Thompson MW, Reed TE (1971) Genetics of childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 8:143-148.
- Wirth B (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat* 15:228-237.
- Wirth B (2002) Spinal muscular atrophy: state-of-the-art and therapeutic perspectives. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 3:87-95.
- Wirth B, Brichta L, Hahnen E (2006) Spinal muscular atrophy: from gene to therapy. *Semin Pediatr Neurol* 13:121-131.
- Wirth B, Brichta L, Hahnen E (2006) Spinal muscular atrophy and therapeutic prospects. *Prog Mol Subcell Biol* 44:109-132.
- Wirth B, Rudnik-Schoneborn S, Hahnen E, Rohrig D, Zerres K (1995) Prenatal prediction in families with autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy (5q11.2-q13.3): molecular genetics and clinical experience in 109 cases. *Prenat Diagn* 15:407-417.
- Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, Wienker T, Zerres K (1999) Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 64:1340-1356.
- Wolpaw JR, Tennissen AM (2001) Activity-dependent spinal cord plasticity in health and disease. *Annu Rev Neurosci* 24:807-843.
- Wolstencroft EC, Mattis V, Bajer AA, Young PJ, Lorson CL (2005) A non-sequence-specific requirement for SMN protein activity: the role of aminoglycosides in inducing elevated SMN protein levels. *Hum Mol Genet* 14:1199-1210.
- Xie J, Black DL (2001) A CaMK IV responsive RNA element mediates depolarization-induced alternative splicing of ion channels. *Nature* 410:936-939.
- Xu C, Chen X, Grzeschik SM, Ganta M, Wang CH (2011) Hydroxyurea enhances SMN2 gene expression through nitric oxide release. *Neurogenetics* 12:19-24.
- Yadav A, Kalita A, Dhillon S, Banerjee K (2005) JAK/STAT3 pathway is involved in survival of neurons in response to insulin-like growth factor and negatively regulated by suppressor of cytokine signaling-3. *J Biol Chem* 280:31830-31840.
- Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D (1999) Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7324-7329.
- Yamane A, Mayo M, Shuler C, Crowe D, Ohnuki Y, Dalrymple K, Saeki Y (2000) Expression of myogenic regulatory factors during the development of mouse tongue striated muscle. *Arch Oral Biol* 45:71-78.
- Yang SH, Shore P, Willingham N, Lakey JH, Sharrocks AD (1999) The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *Embo J* 18:5666-5674.

- Yong J, Wan L, Dreyfuss G (2004) Why do cells need an assembly machine for RNA-protein complexes? *Trends Cell Biol* 14:226-232.
- Yoon S, Lee CH, Lee KA (2010) Determination of SMN1 and SMN2 copy numbers in a Korean population using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Korean J Lab Med* 30:93-96.
- Young PJ, Le TT, thi Man N, Burghes AH, Morris GE (2000) The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. *Exp Cell Res* 256:365-374.
- Young PJ, Jensen KT, Burger LR, Pintel DJ, Lorson CL (2002) Minute virus of mice NS1 interacts with the SMN protein, and they colocalize in novel nuclear bodies induced by parvovirus infection. *J Virol* 76:3892-3904.
- Young PJ, Day PM, Zhou J, Androphy EJ, Morris GE, Lorson CL (2002) A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy. *J Biol Chem* 277:2852-2859.
- Young PJ, DiDonato CJ, Hu D, Kothary R, Androphy EJ, Lorson CL (2002) SRp30c-dependent stimulation of survival motor neuron (SMN) exon 7 inclusion is facilitated by a direct interaction with hTra2 beta 1. *Hum Mol Genet* 11:577-587.
- Young PJ, Francis JW, Lince D, Coon K, Androphy EJ, Lorson CL (2003) The Ewing's sarcoma protein interacts with the Tudor domain of the survival motor neuron protein. *Brain Res Mol Brain Res* 119:37-49.
- Young PJ, Man NT, Lorson CL, Le TT, Androphy EJ, Burghes AH, Morris GE (2000) The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, SMN, is involved in self-association and SIP1 binding. *Hum Mol Genet* 9:2869-2877.
- Young SH, Poo MM (1983) Spontaneous release of transmitter from growth cones of embryonic neurones. *Nature* 305:634-637.
- Yu CG, Yezierski RP (2005) Activation of the ERK1/2 signaling cascade by excitotoxic spinal cord injury. *Brain Res Mol Brain Res* 138:244-255.
- Zaka M, Rafi MA, Rao HZ, Luzi P, Wenger DA (2005) Insulin-like growth factor-1 provides protection against psychosine-induced apoptosis in cultured mouse oligodendrocyte progenitor cells using primarily the PI3K/Akt pathway. *Mol Cell Neurosci* 30:398-407.
- Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z (2006) The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem* 54:1177-1191.
- Zellweger H, Hanhart E (1972) The infantile proximal spinal muscular atrophies in Switzerland. *Helv Paediatr Acta* 27:355-360.
- Zerres K, Rudnik-Schoneborn S, Forkert R, Wirth B (1995) Genetic basis of adult-onset spinal muscular atrophy. *Lancet* 346:1162.
- Zhang C, Xu D, Li Y, Liu N, Wang L, Lu Z (2004) Effect of autonomic nervous system on the transmural dispersion of ventricular repolarization in intact canine. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 24:37-40.
- Zhang HL, Pan F, Hong D, Shenoy SM, Singer RH, Bassell GJ (2003) Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci* 23:6627-6637.
- Zhang HM, Li L, Papadopoulou N, Hodgson G, Evans E, Galbraith M, Dear M, Vougier S, Saxton J, Shaw PE (2008) Mitogen-induced recruitment of ERK and MSK to SRE promoter complexes by ternary complex factor Elk-1. *Nucleic Acids Res* 36:2594-2607.
- Zhang ML, Lorson CL, Androphy EJ, Zhou J (2001) An in vivo reporter system for measuring increased inclusion of exon 7 in SMN2 mRNA: potential therapy of SMA. *Gene Ther* 8:1532-1538.
- Zhu Z, Jiang W, Sells JL, Neil ES, McGinley JN, Thompson HJ (2008) Effect of nonmotorized wheel running on mammary carcinogenesis: circulating biomarkers, cellular processes, and molecular mechanisms in rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:1920-1929.
- Ziff EB (1997) Enlightening the postsynaptic density. *Neuron* 19:1163-1174.
- Zou J, Barahmand-pour F, Blackburn ML, Matsui Y, Chansky HA, Yang L (2004) Survival motor neuron (SMN) protein interacts with transcription corepressor mSin3A. *J Biol Chem* 279:14922-14928.
- Zukin RS, Bennett MV (1995) Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci* 18:306-313.

ANNEXES

6. Liste des Abréviations

5-HT_{2A}R : récepteurs à la sérotonine de type 2A
AChR : récepteur à l'acétylcholine
ADN : acide désoxyribonucléique
Alfp : α -fetoprotein
ASF/SF2 : alternative Splicing Factor/Splicing Factor 2
ARN : acide ribonucléique
AVP : acide valproïque
Bcl-2 : B-cell leukemia oncogene-2
BDNF : brain-Derived Neurotrophic Factor
BIR : Baculovirus Inhibitor of apoptosis Repeats
CaMKII : Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II
CANP : Calcium-Activated Neutral Protease
ChAT : acétylcholine transférase
CREB : cAMP response element-binding protein
CRTC : CREB regulated transcription coactivator
CT-1 : cardiotrophine 1
Elk-1 : E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1
EMG : électromyogramme
ERK : Extracellular-Signal Regulated Kinase
ESE : Exonic Splicing Enhancer
ESS : Exonic Splicing Silencer
FGF : Fibroblast Growth Factor
GDNF : Glial cell Derived Neurotrophic Factor
Gems : gemini of coiled bodies
GSK3 : Glycogène Synthase Kinase 3
HDAC : histone déacétylase
hnRNP A1 : heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
HPRT : Hypoxanthine Phosphoribosyl-Transferase
HSA : α -actine humaine
IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1
IGF-1R : Insulin-like Growth Factor-1 Receptor
IGF-2R : Insulin-like Growth Factor-2 Receptor
IGFBP : Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IRS : Insulin Receptor Substrat
JAK : janus kinase
JNM : jonction neuromusculaire
MAP : Mitogen Activated Protein
MEK : MAP kinase kinase
MK801 : dizocilpine, 5R,10S)-[+]-5-methyl-10,11- dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine
MPZ : Myelin Protein Zero
MRF : Myogenic Regulating Factors
MyHC : Myosin Heavy Chain
NAIP : Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NMDAR : récepteur au N-méthyl-D-aspartate
NR1 : sous-unité 1 du récepteur au N-méthyl-D-aspartate
NR2 : sous-unité 2 du récepteur au N-méthyl-D-aspartate
NR3 : sous-unité 3 du récepteur au N-méthyl-D-aspartate
NSE : Neuron Specific Enolase
Pax3 : paired box gene 3
PI3K : Phosphatidyl Inositol 3-Kinase
PKA : protéine kinase A
PMP 22 : Peripheral Myelin Protein 22

PRMT5 : protein arginine N-methyltransferase 5
PSD 95 : Post Synaptic Density protein 95
RHA : helicase ARN A
RhoA/ROCK: Ras homolog gene family, A/Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase
SAHA : acide hydroxyamique Suberoylanilide
scAAV9 : vecteur viral adéno-associé auto-complémentaire, sérotype 9
SIP1 : SMN Interacting Protein 1
SMA : Spinal Muscular Atrophy
SMN : Survival of Motor Neuron
snoRNP : small nucléolar Ribonucleoprotein
snRNA : small nuclear Ribonucleic Acid
snRNP : small nuclear Ribonucleoprotein
SOCS : Suppressor of Cytokine Signaling
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
SR : serine/arginine rich
TCF/LEF : T-Cell Factor/Lymphoid-Enhancer Factor
TFIIH : Transcription Factor II H
TSA : trichostatine A
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

7. Lexique

Aplasie : arrêt du développement d'un tissu ou d'un organe survenant après la naissance.

Apoptose : processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. Cette mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, est nécessaire à la survie des organismes multicellulaires.

Atélectasie : affaissement des alvéoles pulmonaires. Ces dernières sont dépourvues de leur ventilation tandis que leur perfusion sanguine persiste.

Atrophie : désigne la diminution du volume ou du poids d'un tissu. Elle fait le plus souvent suite à une déficience ou à une destruction d'un ou plusieurs vaisseaux sanguins, d'une atteinte nerveuse ou d'une déficience en nutriments.

Autocrine : qualifie un messenger chimique qui agit sur la cellule même qui l'a produit

Autosomes : chromosomes transmettant les caractères héréditaires mais n'intervenant pas dans la détermination du sexe. L'être humain, possède 44 chromosomes autosomes, et 2 chromosomes sexuels (XX chez la femme et XY chez l'homme).

Blastocœle : cavité unique résultant de l'écartement des cellules embryonnaires. A partir du moment où il y a un blastocœle, on ne parle plus de morula, mais de blastocyste.

Caspase : groupe de protéases qui jouent un rôle essentiel dans le phénomène d'apoptose.

Centromère : portion du chromosome qui sépare celui-ci en deux bras : un court désigné par la lettre p et un long désigné par la lettre q. Au niveau du centromère, l'ADN est non codant et hautement répétitif.

Cyphose : déformation de la colonne vertébrale (trop forte convexité).

Endocrine : qualifie un messenger chimique qui se déverse directement dans le sang.

Épissage : processus au cours duquel les exons vont être raboutés et les introns excisés de l'ARN, afin de donner l'ARN mature utilisé pour la traduction en complexes protéiques

Exon : fragments d'un ARN primaire qui se retrouvent dans l'ARN cytoplasmique après épissage.

Fasciculations : brève secousse musculaire involontaire correspondant à l'activation isolée d'une unité motrice.

Flexum : limitation permanente de l'extension, synonyme de « contracture ».

Hétérozygote : organisme qui possède deux versions différentes d'un gène sur un même locus pour chacun de ses chromosomes homologues.

Homozygote : organisme qui possède la même version d'un gène sur un même locus pour chacun de ses chromosomes homologues.

Hypotonie : diminution de la tonicité musculaire. C'est aussi la baisse de l'excitabilité (capacité de réponse à des stimulations) nerveuse et musculaire. L'hypotonie est responsable d'un relâchement musculaire.

Incidence : nombre d'enfants nés au cours d'une année et qui vont présenter un critère, par rapport au nombre de nouveau-nés vivants au cours de la même période.

Intron : portion de gène non codante, qui s'oppose à l'exon. Après la transcription, l'ARN synthétisé va subir un certain nombre de modifications, dont l'épissage, au cours duquel les introns vont être excisés de l'ARN. Les introns ne jouent donc aucun rôle dans le devenir de l'ARN. Leur rôle le plus important est, pour ce qu'il est possible d'observer à ce jour, de permettre une combinatoire lors de l'épissage.

Morula : embryon à un stade très précoce de développement. Ce stade étant atteint lorsque le nombre de cellules est compris entre 16 et 64 cellules, donnant à l'embryon un aspect de « petite mûre ».

Motoneurone : cellule nerveuse directement connectée à un muscle et qui commande sa contraction à l'aide d'une impulsion nerveuse. Cette cellule peut agir sur un petit ou un grand nombre de fibres musculaires, l'ensemble étant appelé une unité motrice. On distingue trois types de motoneurones: les motoneurones alpha, qui innervent les fibres musculaires responsables de la contraction, les motoneurones gamma, qui innervent les fuseaux

neuromusculaires, ajustant ainsi leur sensibilité à l'étirement, ainsi que les motoneurones beta, qui innervent les deux types de fibres.

Muscle squelettique : principaux muscles constituant l'ensemble des muscles striés. Ces muscles sont sous contrôle volontaire du système nerveux central.

Orthologue : deux gènes similaires existants chez deux espèces différentes.

Ostéoporose : fragilité excessive du squelette, due à une diminution de la masse osseuse et à l'altération de la microarchitecture osseuse.

Paracrine : qualifie un messager chimique qui agit dans le voisinage de la cellule qui l'a synthétisé.

Paraplégie : paralysie plus ou moins complète des deux membres inférieurs et de la partie basse du tronc.

Prévalence : nombre d'individus atteints dans une population donnée à un moment donné exprimé par rapport au nombre total d'individus exposés au risque de la maladie.

Sclérose : durcissement d'un tissu ou d'un organe.

Scoliose : déviation sinueuse de la colonne vertébrale.

Septum : une paroi séparant deux régions d'un organe.

Télomère : région hautement répétitive, non codante, d'ADN à l'extrémité d'un chromosome. Les télomères raccourcissent avec l'âge, l'inflammation et le stress.

Tétraplégie : paralysie des quatre membres.

Traduction : interprétation des codons de l'ARN messager en acides aminés. Le code génétique est le système de correspondances permettant à l'ARN d'être traduit en protéine par une cellule. La traduction s'effectue dans le cytoplasme ; elle a besoin d'énergie, des ribosomes, des ARNt, de l'activité enzymatique et d'un plan apporté par l'ARN.

Transcription : processus biologique qui consiste, au niveau de la cellule, à recopier des régions dites codantes de l'ADN en molécules d'ARN (transcrits) qui seront ensuite reconnues par la machinerie de traduction.

Trachéotomie : ouverture pratiquée de manière chirurgicale dans la trachée haute sous le larynx afin d'assurer une perméabilité permanente des voies aériennes.

Varus équin : déformation grave du pied. Coudure à concavité interne de l'axe longitudinal associé à un déséquilibre des muscles du pied et une rétraction du tendon d'Achille.

8. ARTICLE 4

Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis

**Séverine Deforges¹, Julien Branchu¹, Olivier Biondi¹,
Clément Grondard¹, Claude Pariset¹, Sylvie Lécolle¹,
Philippe Lopes^{1,2}, Pierre-Paul Vidal¹, Christophe Chanoine¹
et Frédéric Charbonnier¹**

¹ Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saints-Pères, Laboratoire de Neurobiologie des Réseaux Sensorimoteurs, UMR 7060 CNRS, Equipe Biologie du Développement et de la Différenciation Neuromusculaire, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France.

² Université d'Evry-val-d'Essonne, Bd François Mitterrand, 91000 Evry, France.

8.1. Introduction à l'article 4

Effet de l'exercice physique dans un modèle souris mimant la SLA

Il est largement admis que l'exercice physique est neuroprotecteur et limite la progression de plusieurs maladies neurodégénératives. Cependant, les effets de la course sur le modèle souris SOD1G93A, mimant la SLA, sont contradictoires. En effet, selon le protocole utilisé, la course peut ne pas avoir d'effet (Liebetanz et coll., *Eur J Neurosci*, 2004), activer des mécanismes neuroprotecteurs (Kaspar et coll., *Ann Neurol*, 2005), ralentir l'évolution de la maladie (Kirkinezos et coll., *Ann Neurol*, 2003; Kaspar et coll., *Ann Neurol*, 2005) ou à l'inverse l'accélérer (Mahoney et coll., *Muscle Nerve*, 2004). Il semblerait que l'intensité de l'exercice soit déterminante dans l'activation de mécanismes neuroprotecteurs dans le cadre de la SLA (McCrane et Kaspar, *Neuromolecular Med*, 2008). Suivant cette hypothèse, un exercice physique trop intense serait néfaste et, à l'inverse, un exercice physique d'intensité modérée serait bénéfique.

Afin de tenter de résoudre cette controverse, nous avons comparé les effets de 2 types d'exercices, l'un basé sur un exercice de faible intensité, la course et l'autre basé sur un exercice de forte intensité, la nage. Nous avons utilisé le modèle souris transgénique SOD1G93A, mimant la SLA (Gurney et coll., *Science*, 1994). Celles-ci développent une forme isotypique de la SLA humaine : les symptômes apparaissent vers l'âge de 90 jours au niveau des membres postérieurs et le décès survient vers l'âge de 130 jours.

Nous avons analysé et comparé les effets d'un entraînement à la nage en piscine à courant ajustable et un exercice de course sur tapis roulant motorisé à vitesse réglable. Les souris mimant SLA, ont débuté leurs entraînements quotidiens en phase pré-symptomatique (70 jours), à raison de 30 minutes par jour et 5 jours par semaine. Les souris mimant la SLA sédentaires, quant à elles, ont été placées dans les ergomètres hors tension, également à raison de 30 minutes par jour et 5 jours par semaine. Afin d'évaluer l'impact de la nage ou de la course sur ces souris, nous avons suivi une approche pluridisciplinaire, associant des analyses comportementales à des analyses cellulaires et moléculaires.

Lors des études comportementales, nous avons déterminé la survie moyenne pour chacune des trois populations (nage, course, sédentaire) de souris mimant la SLA. De plus, nous avons mesuré la force physique des membres antérieurs lors de tests de grip et l'activité spontanée durant le test de l'openfield. Les données obtenues chez les souris mimant la SLA entraînées à la nage, à la course ou sédentaires ont été comparées à celles obtenues chez des souris contrôles sédentaires.

Lors des analyses cellulaires, nous avons observé différentes populations cellulaires de la moelle épinière lombaire à l'âge de 115 jours. Dans un premier temps, nous avons étudié le nombre et la surface des motoneurones spinaux innervant les muscles des membres inférieurs. Dans un second temps, nous avons dénombré les populations cellulaires environnant ces motoneurones : les astrocytes, les oligodendrocytes et les progéniteurs neuraux (NPCs). De plus nous avons analysé la morphologie et la typologie de trois muscles squelettiques de la patte arrière, un extenseur lent, le *soleus* ; un extenseur rapide, le *plantaris* et un fléchisseur rapide, le *tibialis*.

Enfin, nous avons étudié le profil d'activation de la caspase-3, un des principaux effecteurs de l'apoptose, par western immunoblot dans les cornes ventrales de la moelle épinière lombaire et par immuno-histochimie dans les colonnes motrices.

Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis

Séverine Deforges¹, Julien Branchu¹, Olivier Biondi¹, Clément Grondard¹, Claude Pariset¹, Sylvie Lécolle¹, Philippe Lopes^{1,2}, Pierre-Paul Vidal¹, Christophe Chanoine¹ and Frédéric Charbonnier¹

¹Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saints-Pères, Laboratoire de Neurobiologie des Réseaux Sensorimoteurs, UMR 7060 CNRS, Equipe Biologie du Développement et de la Différenciation Neuromusculaire, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France

²Université d'Evry-val-d'Essonne, Bd François Mitterrand, 91000 Evry, France

Several studies using transgenic mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) have reported a life span increase in exercised animals, as long as animals are submitted to a moderate-intensity training protocol. However, the neuroprotective potential of exercise is still questionable. To gain further insight into the cellular basis of the exercise-induced effects in neuroprotection, we compared the efficiency of a swimming-based training, a high-frequency and -amplitude exercise that preferentially recruits the fast motor units, and of a moderate running-based training, that preferentially triggers the slow motor units, in an ALS mouse model. Surprisingly, we found that the swimming-induced benefits sustained the motor function and increased the ALS mouse life span by about 25 days. The magnitude of this beneficial effect is one of the highest among those induced by any therapeutic strategy in this disease. We have shown that, unlike running, swimming significantly delays spinal motoneuron death and, more specifically, the motoneurons of large soma area. Analysis of the muscular phenotype revealed a swimming-induced relative maintenance of the fast phenotype in fast-twitch muscles. Furthermore, the swimming programme preserved astrocyte and oligodendrocyte populations in ALS spinal cord. As a whole, these data are highly suggestive of a causal relationship not only linking motoneuron activation and protection, but also motoneuron protection and the maintenance of the motoneuron surrounding environment. Basically, exercise-induced neuroprotective mechanisms provide an example of the molecular adaptation of activated motoneurons.

(Received 29 January 2009; accepted after revision 1 June 2009; first published online 2 June 2009)

Corresponding author F. Charbonnier: University Paris Descartes, Biology, 45 rue des Saints-Pères, Paris 75006, France. Email: frederic.charbonnier@parisdescartes.fr

Abbreviations ALS, amyotrophic lateral sclerosis; CA II, carbonic anhydrase II; ChAT, choline acetyl-transferase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IGF-1, insulin-like growth factor 1; MyHC, myosin heavy chain; NPCs, neural progenitor cells; ROS, reactive oxygen species; SOD1, superoxide dismutase 1.

Amyotrophic lateral sclerosis is a chronic neurodegenerative disease characterised by a progressive motor weakness originating from selective motoneuron cell death. On average, mortality occurs within the 4 years following the occurrence of the first clinical symptoms. The currently available therapy extends survival in humans by approximately 3 months. Thus, developing new therapeutic strategies for ALS is of paramount importance. Mutations in superoxide dismutase 1 (SOD1) have been observed in about 20% of familial ALS patients (Rosen, 1993). SOD1 normally converts superoxide ion, a by-product of mitochondrial metabolism, to water and hydrogen peroxide. Despite the fact that SOD1 activity impairment has been ruled out as the causal event of

the disease (Shefner *et al.* 1999), there is some evidence for a gain in toxic function with the mutant form of SOD1 (Boillée *et al.* 2006). The clinical and morphological abnormalities are common to familial and other forms of ALS, suggesting a common degeneration mechanism. Yet, in spite of the wide variety of possible causes for ALS, including environmental agents, oxidative stress, disturbance of the glutamatergic neurotransmission, a large amount of literature data correlates neuronal cell death to glutamatergic excitotoxicity (Heath & Shaw, 2002). Interestingly, the deleterious effects of glutamatergic excitotoxicity might be decreased by submitting mice to physical exercise training (Carro *et al.* 2000, 2001). These beneficial effects have been linked to

an exercise-induced increase in circulating IGF-1 uptake by neurons (Carro *et al.* 2001). Furthermore, several groups have reported beneficial effects of a moderate running-based training in ALS mouse models including a 10- to 24-day increase in the life span of mutant mice submitted to training in comparison to their sedentary counterparts (Kirkinezos *et al.* 2003; Veldink *et al.* 2003; Liebetanz *et al.* 2004; Kaspar *et al.* 2005). It should be noted, however, that one study reported deleterious effects of high-intensity exercise in ALS mice (Mahoney *et al.* 2004).

Whether there is an exercise-induced neuroprotection is still a matter of debate. According to Veldink *et al.* (2003), the analysis of the spinal cord anatomy of trained *vs* untrained mice revealed no difference in neuron distribution and survival. In contrast, Kaspar *et al.* (2005) reported that physical exercise significantly protected motoneurons from death. These contradictory data concerning the effects of exercise in neuroprotection outline the specific effect exerted by any given exercise protocol *i.e.* treadmill running for Veldink *et al.* (2003) and wheel running for Kaspar *et al.* (2005). Furthermore, although the molecular mechanism(s) underlying the exercise-induced effects is still unknown, the latter results do show that the effect of IGF-1 delivery and exercise are mediated through different molecular mechanisms, which in combination result in synergistic survival (Kaspar *et al.* 2005). If the exercise-induced neuroprotection is not reflecting the action of diffusible factors, such as IGF-1, then, which mechanism(s) could account for both the generally increased resistance of exercised motoneurons to cell death and the specific effect of a given exercise protocol? One cue for resolving this controversy may be to consider a causal link between the motoneuron activation, the adaptation of neuron intrinsic properties and neuroprotection. Indeed, the activation level of selected motoneuron sub-populations is dependent on the exercise type as shown by Grondard *et al.* (2008). Briefly, a swimming-based program was associated with high hindlimb movement amplitude and frequency exercise (4.86 ± 0.40 cm and 373.9 ± 47.6 cycles min^{-1}) preferentially activating a sub-population of large motoneurons (with soma area greater than $700 \mu\text{m}^2$) and a running-based training, described as a low hindlimb movement amplitude and frequency exercise (3.79 ± 0.23 cm and 234.2 ± 24.5 cycles min^{-1}), preferentially activating a sub-population of small motoneurons (with soma area less than $300 \mu\text{m}^2$). Furthermore, only specific sub-populations of small lumbar motoneurons ($<300 \mu\text{m}^2$) adapted their electrophysiological properties in running rats (Beaumont & Gardiner, 2002). Thus, an essential requirement would be to test whether motoneuron activation leads to their specific resistance to ALS-induced cell death, in contrast to resting neurons.

To directly address the importance of exercise intensity regulation and the existence of an exercise-induced neuroprotection in ALS mice, we have compared the efficiency of either a daily swimming- or running-based training, on the basis of our previous experiments on control mice (Grondard *et al.* 2008). We provide experimental evidence suggesting a relationship between exercise-induced motoneuron activation and their subsequent protection. Furthermore, our data revealed an unexpected link between exercise-induced neuroprotection and the maintenance of the motoneuron cell environment, in particular, the astrocytes that have been recently pointed out as regulators of ALS progression (Yamanaka *et al.* 2008).

Methods

Mice

The care and treatment of animals followed the national authority (Ministere de la Recherche et de la Technologie, France) guidelines for the detention, use and the ethical treatment of laboratory animals. All experimental procedures which include minimizing the number of animals used and their suffering were approved by the policies of the French Agriculture and Forestry Ministry.

Transgenic male mice with the G93A human SOD1 mutation B6SJL-Tg (SOD1-G93A) 1Gur/J (ALS mice) were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Male mice B6SJL (Janvier, le Genest, France) served as control for this mutant strain.

Disease onset was defined as the time corresponding to the first observation of myotony symptoms in the mice hind limb. Death was scored when mice were unable to stand on their feet 30 s after having been placed on their side. Then, the moribund mice were killed with CO_2 .

All the experiments using mice were performed in a blind systematic fashion so as to minimize bias.

Training protocol

At 70 days of age, colour randomly assigned transgenic male were trained 30 min a day, 5 days a week as performed in previous studies using ALS mice (Kirkinezos *et al.* 2003; Veldink *et al.* 2003). Training was performed until 115 days of age or until death. Twenty ALS mice (running ALS) were submitted to a running-based training on a speed-regulated treadmill (max. 13 m min^{-1}) and 25 ALS mice (swimming ALS) were submitted to a swimming-based training in an adjustable-flow swimming pool (max. 51 min^{-1}), as previously described (Grondard *et al.* 2008). A third group of 50 ALS mice (sedentary ALS) and 10 control mice were placed in the pool without flow (25 ALS

mice and 5 controls) and floated at the water surface accordingly exhibiting a poor activity or on the treadmill without speed (25 ALS mice and 5 controls). Likewise, these untrained animals which were studied in parallel only displayed an exploratory activity for the whole duration of training of the previously described animal groups.

Core body temperature was determined using a calibrated digital thermometer (Fischer Scientific Company) equipped with a rectal probe designed for rodents.

Behavioural study

General characteristics of mice were given using weight, forelimb grip strength and spontaneous activity ($n=8$ in each group). Sedentary and trained mice between 70 and 126 days old were tested once a week and all of the tests were performed blindly (the group assignment being unknown to the observers). The time during which the animals were able to sustain their weight holding onto a metal rail suspended in midair was recorded with the maximum time being 180 s. Each mouse was subjected to three trials with at least a 10 min resting period between tests. The ambulatory behaviour was assessed in an open-field test. The apparatus consisted of a wooden box measuring 50 cm \times 50 cm \times 20 cm. The floor of the arena was divided into 25 equal squares of 10 cm. Squares adjacent to walls were referred to as periphery and the nine remaining squares were referred to as centre. The mice were tested individually and the open field was washed after each session. Each mouse was placed in a central square on the open field and was allowed to move freely for 5 min. The number of peripheral and central square crossings was scored manually by the experimenter.

Histological evaluation

Mice at 115 days old ($n=8$ in each group) were anaesthetized by intraperitoneal injection of 3.5% chloral hydrate and perfused transcardially with buffered saline and 4% paraformaldehyde. The L1 to L5 lumbar region of the spinal cord was processed for vibratome sectioning at 40 μ m thickness and one out of every six sections was subsequently processed for immunostaining on free-floating sections. The immunohistochemical analysis was based on detection of choline acetyl-transferase (goat anti-ChAT, 1/800, Chemicon International, Temecula, CA, USA) to stain motoneurons, glial fibrillary acidic protein (rabbit anti-GFAP, 1/100, Dako, Glostrup, Germany) to stain astrocytes, carbonic anhydrase II (rabbit anti-CA II, 1/100; Ghandour *et al.* 2000) to stain oligodendrocytes and nestin (mouse anti-nestin, 1/300, Chemicon International)

to stain neural progenitor cells (NPCs). Secondary antibodies used were donkey anti-species-specific antibodies associated with the fluorophores Alexa Fluor 568 anti-goat IgG (1/500, Molecular Probes), Alexa Fluor 488 anti-rabbit (1/500, Jackson-ImmunoResearch laboratories, West Grove, PA, USA) and Cy2 anti-mouse (1/500, Jackson-ImmunoResearch laboratories). Sections were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and visualized using a BX51 Olympus microscope and Q Imaging Fast 1394 Retiga 2000 R camera.

For each mouse, 10 sections of lumbar spinal cord were studied. All cells were counted from within the ventral horn below a lateral line across the spinal cord and from the basis of the central canal. Only neuronal cells with the presence of a nucleolus located within the nucleus were counted. Motoneuron soma areas were evaluated using Image J v1.33 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Muscle typology immunofluorescence

At 115 days old ($n=5$), soleus, plantaris and tibialis muscles were frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and transverse 10 μ m cryostat sections were used for muscle typology. Fresh-frozen sections of each muscle were fixed with acetone and incubated with mouse antibodies raised against myosin heavy chains (MyHC): NCL-MyHCs (anti-MyHC I, slow), NCL-MyHCf (anti-MyHC II, fast) (Novocastra, Newcastle, UK), A4.74 (anti-MyHC IIa) and B.E.F.3 (anti-MyHC IIb) (DSHB, IA, USA) at a dilution of 1:20. Secondary antibodies used were rabbit anti-species-specific antibodies conjugated with Cy2 or Cy3 (1:20, Dako). Sections were visualized as described above. For each mouse, three sections of each muscle were studied. Each MyHC count and soma areas were evaluated using Image J v1.33 software. The percentage of fibre IIx was determined as the difference between the total number of type II fibres and the sum of type IIa and IIb fibres [$\text{IIx} = \text{II} - (\text{IIb} + \text{IIa})$].

Apoptosis evaluation

For immunohistochemical analysis, the activated caspase-3 was detected by a rabbit anti-activated caspase-3 antibody (1:20, Chemicon International) and motoneurons were detected as described above. Donkey anti-species-secondary antibodies were associated with the fluorophores Alexa Fluor 568 anti-goat IgG (1:500, Molecular Probes) and Alexa Fluor 488 anti-rabbit (1:500, Jackson-ImmunoResearch).

For Western blot analysis, the ventral horn part of the lumbar spinal cord of 115-day-old mice ($n=3$ in each group) was frozen in isopentane and lysed

with RIPA buffer supplemented with protease inhibitors (20 mM orthovanadate, 25 mM pyrophosphate; Sigma, Saint Quentin, Fallavier, France). Protein concentration of the clarified homogenates (4°C, 15 min, 12 000g) was determined using the Bradford protein microassay procedure (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA). After addition of a loading buffer, protein samples were electrophoresed on a 10% SDS–polyacrylamide gel and transferred on to PVDF membranes (Biorad Laboratories). The activated caspase-3 was detected with an antibody specific for cleaved forms of caspase-3 (1:1000, rabbit anti-activated caspase-3, Promega, Madison, WI, USA) and revealed with a goat peroxidase-conjugated secondary antibody directed against rabbit immunoglobulins (1:7500, Jackson Immunoresearch). Bound antibody complexes were developed using the ECL plus kit and exposed to hyperfilm ECL-plus X ray film (Amersham Biotech, Les Ulis, France). After stripping, membranes were incubated with a mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase monoclonal antibody (1:5000, Chemicon International) and revealed with a goat peroxidase-conjugated secondary antibody directed against mouse immunoglobulins (1:5000, Jackson Immunoresearch).

Statistical analysis

For the behavioural study, data are presented as mean and standard error of mean ($n = 8$). A one-way ANOVA for repeated measures with Tukey's *post hoc* analysis was performed on the data. For the other studies, all values are displayed as means and standard deviation within each group. A Kolmogorov–Smirnov normal distribution analysis was performed on all data followed by either a Student's *t* test for normally distributed data or a non-parametric Kruskal–Wallis test, to verify significant differences between groups (Systat v 8.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All the analyses have been statistically powered to ensure significant scientific statements. All the data presented in this study have a statistical power of 90% (AnaStats.fr, France).

Results

Life span extension and behavioural improvement depend on the exercise type in ALS mice

We submitted two populations of ALS mice to a daily swimming- or running-based training, on the basis of our previous experiments on control mice (Grondard *et al.* 2008). These protocols started in the asymptomatic phase of the disease (70 days). The swimming programme resulted in the significant delay of 16 days ($P < 0.001$) for the appearance of symptoms, from 93 ± 8 days in sedentary ALS mice to 109 ± 15 days in swimming ALS

mice (Fig. 1A). Furthermore, the mean survival increased from 127 ± 9 days in sedentary ALS mice to 153 ± 24 days in swimming ALS mice, corresponding to an improvement of 25 days ($P < 0.01$) in the survival of ALS mice (Fig. 1B). In contrast, no effect on the appearance of symptoms or in survival could be recorded with the running-based training.

In order to evaluate the motor function benefits induced by each exercise programme, we subjected the mice of each group to a grip test and to an open field test. All ALS mice presented a reduced body weight compared to controls (Fig. 1C). The weight of sedentary and running ALS mice decreased from 112 days until death. In contrast, the weight of the swimming ALS mice remained constant until 120 days ($P < 0.05$). In the grip test, the average time sedentary and running ALS mice could sustain their weight using their forelimb muscles decreased from 105 days and these mice were unable to grip after 119 days (Fig. 1D). In contrast, the swimming ALS mice had enough strength to grip for a time comparable to controls, up to 119 days ($P < 0.05$). Near death, the swimming ALS mice showed difficulties to sustain the grip.

We then compared the spontaneous activity of the mice in an open field test (Fig. 1E). A significant decrease in locomotion activity was found in running ALS from 91 days of age and in sedentary ALS mice from 105 days of age when compared to controls ($P < 0.05$). In contrast, the swimming ALS mice maintained a near to normal locomotion activity until 112 days of age.

Motoneuron protection depends on the exercise type

The comparison of the lumbar motoneuron populations in the trained and sedentary ALS mice at 115 days of age showed remarkable differences in the neuroprotective potentials of each exercise (Fig. 2). A dramatic motoneuron loss was recorded in the ventral horns of the sedentary and the running ALS mice with a 49% and 45% reduction, respectively (Fig. 2B). Likewise, the motoneuron distribution in sedentary and the running ALS mice exhibited a decrease in the proportion of motoneurons exhibiting medium (between 300 and $700 \mu\text{m}^2$) and large (greater than $700 \mu\text{m}^2$) soma in comparison to control mice, with a slight reduction in the absolute number of motoneurons exhibiting soma larger than $500 \mu\text{m}^2$ (Fig. 2C). As a consequence, an increased proportion of motoneurons exhibiting small soma area (less than $300 \mu\text{m}^2$) was observed. In contrast, the swimming-based training in ALS mice exhibited a neuroprotective potential with only a 28% reduction of motoneurons in comparison to controls. Interestingly, the swimming-induced protection from neuronal loss was readily apparent for motoneurons exhibiting medium size soma (between 300 and $700 \mu\text{m}^2$).

The relative maintenance of the muscle phenotype is also dependent on the exercise type

Since muscle weakness is a major cause of disability in ALS, we investigated whether the running- and the swimming-induced protection of motoneurons led to the maintenance of the muscle phenotype. Our count of neurons was performed in the lumbar spinal cord from which the sciatic nerve originates, then we analysed the phenotype of three muscles of the calf innervated by the sciatic nerve, namely two extensor muscles of the ankle, the slow-twitch soleus and the fast-twitch plantaris, and a flexor muscle of the ankle, the fast-twitch tibialis. According to all the phenotypic criteria we used (i.e. the number of myofibres, their cross-section area and the muscle typology), only the swimming-based training efficiently preserved the ALS muscle phenotype close to the corresponding control muscles (Fig. 3). The ALS muscles displayed a significant hypoplasia that appeared

particularly severe for the slow-twitch soleus, suggesting that the level of muscular impairment was related, at least in part, to the muscle type (Fig. 3A). Unlike running, swimming efficiently counteracted the hypoplasia in the soleus. Furthermore, the ALS soleus muscle displayed a dramatic atrophy that was rescued by both training programmes (Fig. 3D). In the fast-twitch muscles, only the fast IIb fibres were atrophied in ALS mice. Both exercises limited this atrophy. In sedentary ALS fast-twitch muscles, we found a significant fast-to-slow transition from fast-twitch type II fibres to slow-twitch type I fibres and, within the type II fibre population, from type IIb/IIx to IIa fibres, concurring with the findings of Hegedus *et al.* (2008) (Fig. 3C). In contrast, the typology of the slow-twitch soleus indicated a slow-to-fast transition. The running programme induced opposite effects on the three muscle typology, counteracting the fast-to-slow transition in the tibialis, but worsening those of the

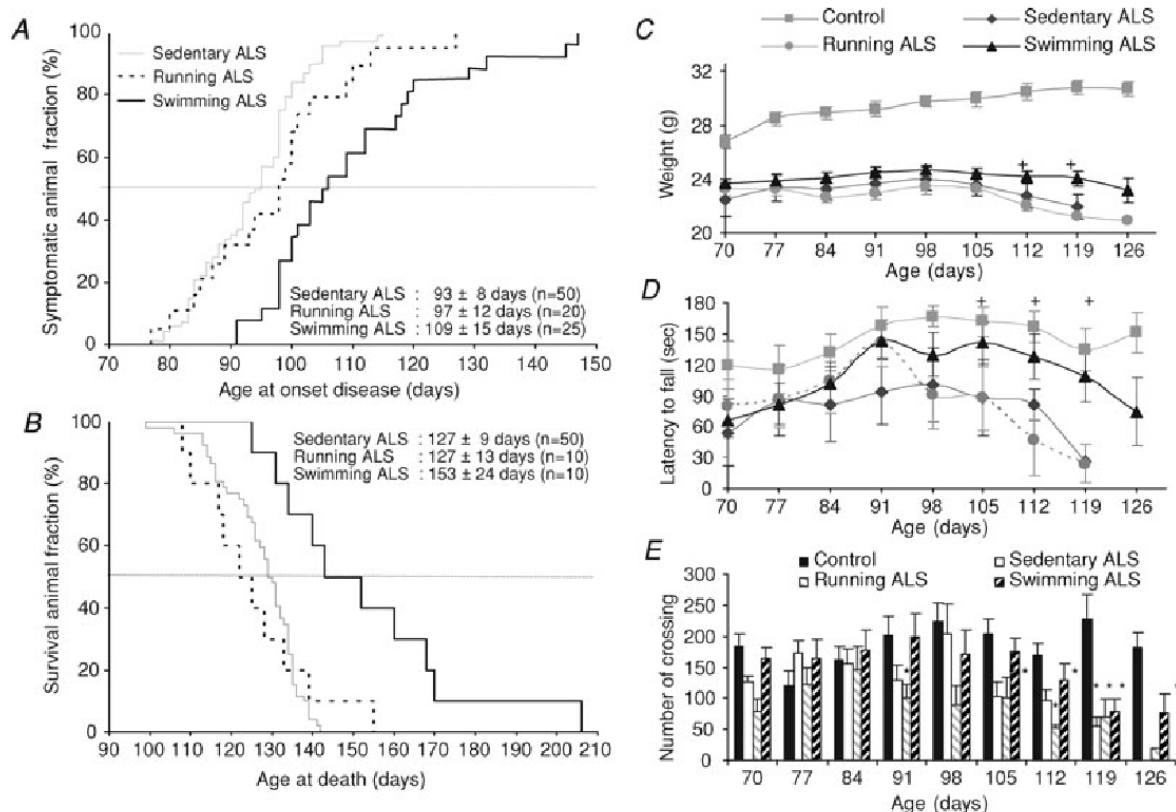


Figure 1. Differential effects of either a swimming- or a running-based training in ALS mice

Only the swimming programme delays disease onset (A) and extends survival (B) in ALS mice as shown by Kaplan–Meier curves. The mean time to disease onset was delayed by 2 weeks ($P < 0.001$) and the mean time to death was delayed by 3 weeks ($P < 0.01$) for the swimming ALS mice compared to the sedentary and the running ALS mice. Swimming delays the onset of disease symptoms, including a stabilization of the body weight (C), a delay in disease-related weakness as shown by the performance assessment of forelimb strength (grip test) (D) and the level of spontaneous exploratory activity (open field) (E). The behavioural data are shown as mean \pm S.E.M. ($n = 8$; $*0.01 < P < 0.05$), *control versus ALS mice or +swimming ALS versus other ALS groups).

plantaris, leading to a decrease of type IIb fibres and being unable to correct the slow-to-fast transition in the soleus. However, the swimming-based training led to the maintenance of muscle typology in all three muscles.

Exercise-induced control of non-neuronal spinal cell populations in ALS mice

Several studies support the hypothesis that multiple cell types drive the motor degeneration in ALS mice, in association with a direct damage of motoneurons (Hall *et al.* 1998; Yamanaka *et al.* 2008). We therefore analysed the influence of each exercise mode on the cell types that lay beyond the motoneurons in ALS mice at 115 days of age. We first analysed the astrocyte population in the spinal cord of control mice and sedentary, running and swimming ALS mice (Fig. 4A). Astroglia and astrocytic activation as assessed by using GFAP immunostaining were significantly increased in sedentary and running ALS mice. A significant increase in astrocyte density was noted throughout the lumbar

spinal cord (about 40% in sedentary and running ALS mice and only 3% in swimming ALS mice), with a high concentration in the ventral horn (Fig. 4B). Furthermore, compared with the long, thin, filament-like GFAP staining observed in controls, GFAP staining in ALS astrocytes was more condensed and brightly fluorescent, although the filaments often appeared shorter in length. In contrast, no significant astroglia was detected in the swimming ALS mice. We secondly evaluated the oligodendrocyte population, on a type II carbonic anhydrase immunostaining basis (Fig. 4C). We found a 30% decrease in oligodendrocytes in the ventral spinal cord of sedentary and running ALS mice compared with controls (Fig. 4D). Interestingly, the swimming-based training led to the maintenance of the oligodendrocyte population in the ALS spinal cord. Finally, we evaluated the neural progenitor cells (NPC) population through the count of nestin-positive cells (Fig. 4E). We observed a significant increase in NPCs throughout the spinal cord of sedentary ALS mice compared to a very discrete presence of NPCs in controls, in agreement with previous studies (Chi *et al.*

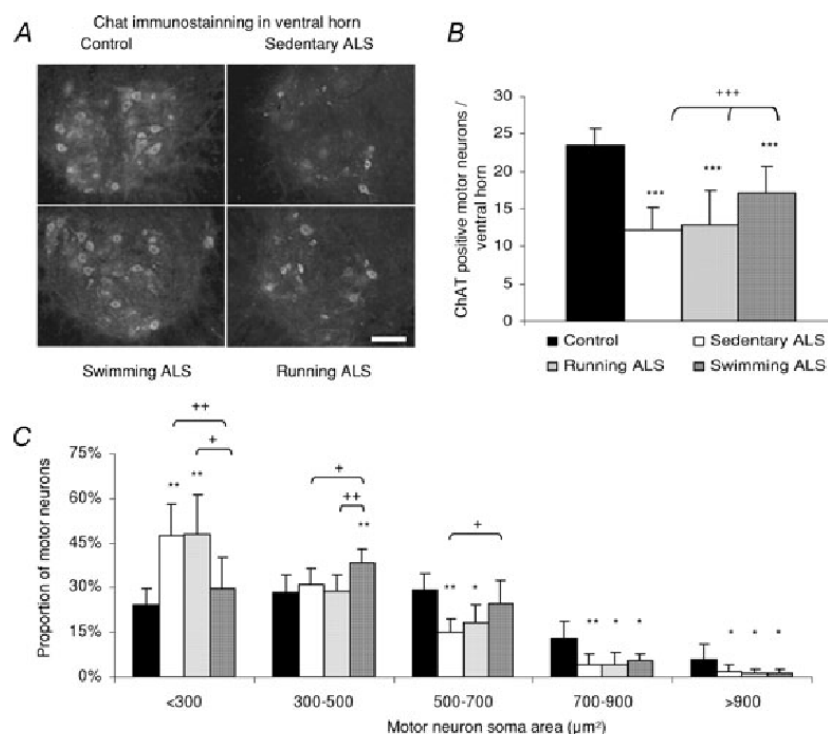


Figure 2. Only the swimming-based training significantly protects lumbar motoneurons in ALS mice

A, representative images showing motoneuron populations identified using ChAT immunostaining in the ventral horn of the lumbar spinal cord from control mice and sedentary, running and swimming ALS mice (scale bar: 50 μm). B, quantification of surviving motoneurons in control mice and sedentary, running and swimming ALS mice at 115 days of age. Data are shown as mean ± s.d. C, morphometric evaluation of surviving motoneurons in control mice and sedentary, running and swimming ALS mice at 115 days of age. Percentage of motoneurons by soma area (distribution: 200 μm²) are shown as mean ± s.d. (n = 8; ***P < 0.001, **0.001 < P < 0.01, *0.01 < P < 0.05), *control versus ALS mice or +swimming ALS versus other ALS groups.

2006). The running- and the swimming-based training induced a significant decrease in the number of NPCs, with, respectively, a 39% and a 58% reduction compared to sedentary ALS mice.

The swimming programme limits apoptosis in the lumbar spinal cord of ALS mice

To verify whether the swimming-based training limits the apoptosis process in the spinal cord of ALS mice, we evaluated the activation of the caspase pathway at 115 days of age. The quantification of the active form of caspase-3 in the ventral spinal cord of sedentary ALS mice showed that

the apoptosis process was limited in swimming-trained compared to sedentary and running-trained ALS spinal cords (Fig. 5).

Exercise protocols do not modify body core temperature

A difference between the two exercise conditions could be a change in core temperature during exercise and this could influence neuroprotective mechanisms (Dietrich *et al.* 2009). The core body temperature was determined in 12 trained control animals. No significant difference in body temperature of the trained control mice was found before (T0) and after training (T30) (Fig. 6).

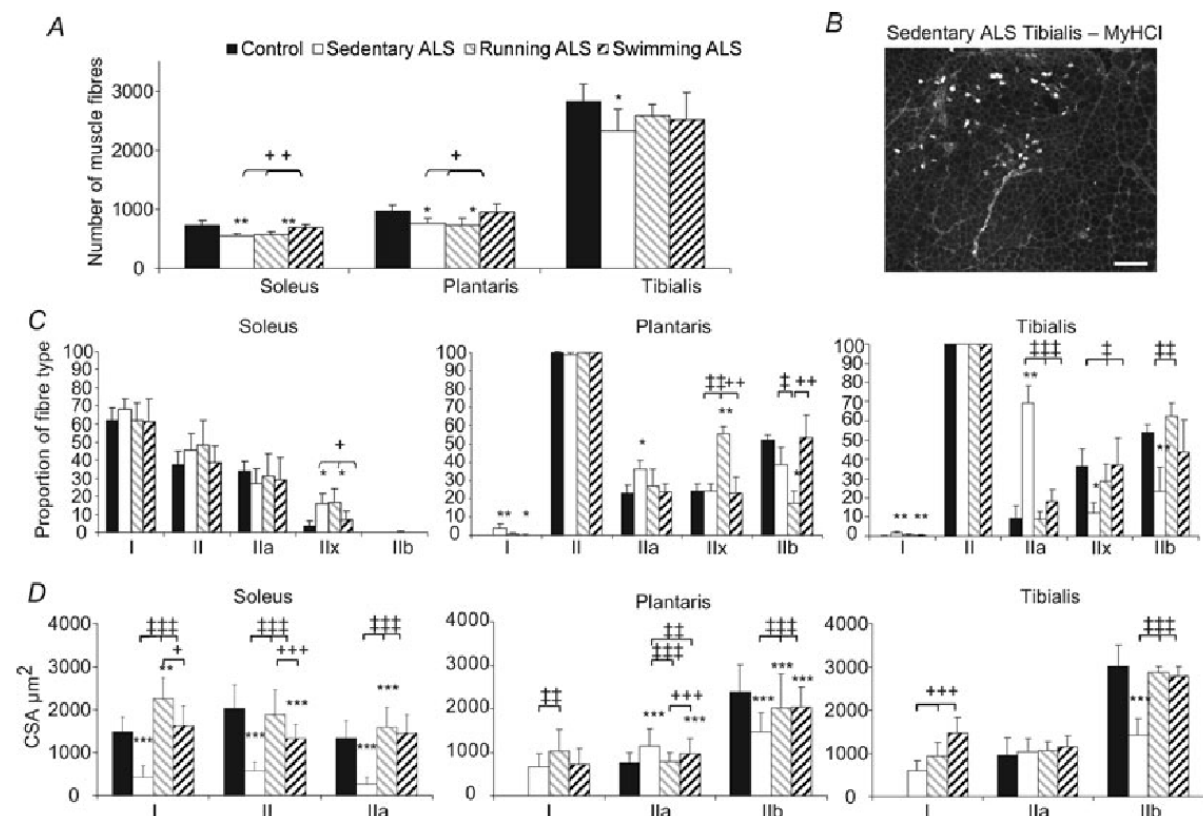


Figure 3. Differential effects of swimming- and running-based training programmes in sustaining the skeletal muscle phenotype in ALS mice

Only the swimming programme limits the hypoplasia affecting the two extensor muscles, namely the slow-twitch soleus and the fast-twitch plantaris from ALS mice at 115 days of age (A). Both exercises limit the hypoplasia detected in the fast-twitch flexor tibialis. B, representative image showing a type I fibre appearance in a fast-twitch tibialis in sedentary ALS mice. Scale bar: 200 μm . Analysis of the muscle typology in ALS muscles compared to controls (C) reveals a slow-to-fast myofibre transition in the slow-twitch soleus, and a fast-to-slow myofibre transition in the fast-twitch plantaris and tibialis that are significantly limited by the swimming programme. The running- and the swimming-based training programmes significantly decrease the severe muscular atrophy detected in all myofibre types in soleus, and in IIb myofibre in plantaris and tibialis ALS muscles as shown by the evolution of the cross-section area (CSA) of each fibre type (D). Data are shown as mean \pm s.d. ($n = 5$; an average of 3 sections of each muscle per animal at 115 days old was used; * $0.01 < P < 0.05$, ** $0.001 < P < 0.01$, *** $P < 0.001$, *control versus ALS groups, ‡sedentary ALS versus training ALS groups, +swimming ALS versus other ALS groups).

Discussion

This study provides evidence for significant beneficial effects of forced swimming on the life span of ALS mice as well as on the associated clinical symptoms. Survival was extended by about 20% of life span, which can be considered as one of the best treatments tested on ALS animals when starting at the onset of symptoms (Carri *et al.* 2006).

In our exercise conditions, swimming can be described as a high movement amplitude and frequency exercise, and running as a low movement amplitude and frequency exercise (Grondard *et al.* 2008). Accordingly, swimming preferentially activates large motoneurons, belonging to fast motor units (i.e. a medium- and large-size soma motoneuron and a great number of large diameter muscle fibres, of the faster type II) and, in contrast, running preferentially activates small motoneurons belonging to slow motor units (i.e. a motoneurons of small soma

area and a low number of type I muscle fibres). Here, we show that swimming, in striking contrast to running, preferentially protects medium-size motoneurons (between 300 and 700 μm^2) in ALS spinal cord but not the smaller ones (less than 300 μm^2). Taken together, these data strongly suggest that the exercise-activated neurons are selectively protected against cell death, in contrast to resting neurons. Accordingly, the running programme led to a limited neuroprotection that is mainly observed for the motoneurons of small soma area (less than 300 μm^2). These data account for the evolution of the muscular phenotype in three skeletal muscles differing in their nature and function. Only the swimming-based training was able to completely counteract the hypoplasia detected in all muscles and notably in the soleus that unexpectedly appeared affected by a severe lost of muscle fibres. Furthermore, only the swimming-based training led to the maintenance of the faster myofibre population to a level comparable to

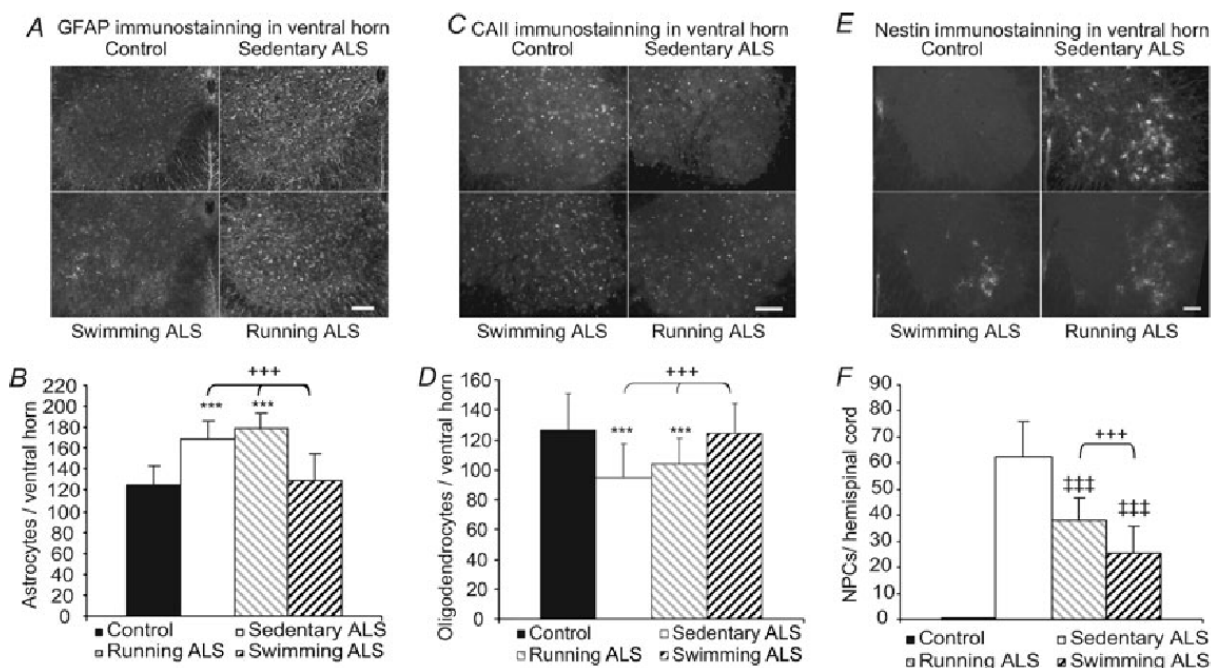


Figure 4. Differential effects of swimming- and running-based training programmes in maintaining the non-neuronal cell populations in the lumbar spinal cord of ALS mice

A, representative images showing a population of astrocytes in control mice and in sedentary, running and swimming ALS mice using glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunostaining. The quantification of astrocytes in the ventral horn of the lumbar spinal cord reveals a severe astrogliosis in sedentary and running ALS mice that is limited by swimming exercise (B). C, representative images showing a population of oligodendrocytes in control, sedentary, running and swimming ALS mice using CALL immunostaining. The unexpected ALS-induced decrease of oligodendrocyte population is limited by swimming exercise (D). E, representative images showing a population of neural progenitor cells (NPC) in control mice and sedentary, running and swimming ALS mice using nestin immunostaining. Cell quantification in hemi-spinal cord reveals a limited NPC proliferation in swimming-exercised mice (E). All scale bars: 100 μm . Number of cells are shown as mean \pm s.d.; ($n = 5$; 10 sections of spinal cord per animal). *** $P < 0.001$, *control versus ALS mice or +swimming ALS versus other ALS groups or ‡sedentary ALS versus training ALS groups).

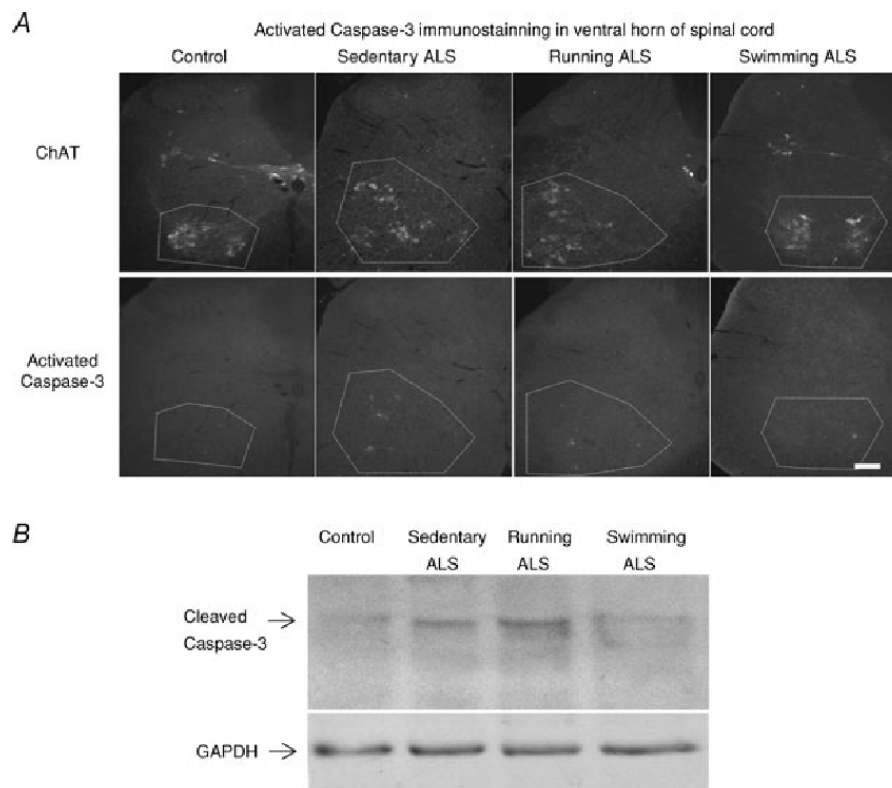


Figure 5. The swimming-based training limits cell death

The swimming programme induces a reduction of apoptotic cells as shown by immunodetection of active caspase-3 in the ventral horn of the lumbar spinal cord from control mice and sedentary, running and swimming ALS mice at 115 days of age (A) and by Western blot (B) ($n = 3$ in each group). Scale bar: 100 μm .

controls in the three tested muscles. Taken together, these results account for the swimming-induced enhancement of the fast motor-unit activity, probably leading to their maintenance and finally to their protection. Interestingly, both exercise programmes displayed comparable potential to counteract the muscular atrophy favouring the hypothesis of an exercise-induced production of a muscle trophic diffusible factor.

Consequently, the molecular mechanism(s) underlying swimming-induced neuroprotection reflects not so much the modulated expression of a diffusible factor, such as IGF-1, which would have indiscriminately protected the whole neuron population by an endocrine or paracrine way, but an intrinsic modification of activated neurons. This concurs with the result of Kaspar *et al.* (2005) showing distinct molecular mechanisms of action between the IGF-1 delivery and exercise, which, in combination, results in synergistic survival. In addition, the differential exercise effects found in the present study are unlikely to come from a difference in exercise intensity. Indeed, our swimming protocol, a high movement frequency and amplitude exercise when compared to our running

protocol (Grondard *et al.* 2008), should be detrimental according to Mahoney *et al.* (2004). In striking contrast with this assumption, swimming induced beneficial effects whereas running did not. Repeated electrical activation of the same neuronal network might induce an intrinsic

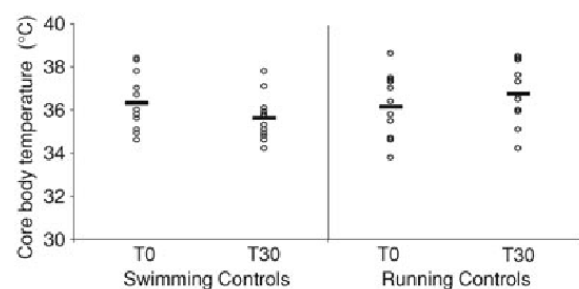


Figure 6. Effects of swimming and running-based training programmes on the core body temperature of control mice

Monitoring of core body temperature before (T0) and after training (T30). Chart representation of core body temperature for each animal ($n = 12$, \circ); means are indicated by a bar. No significant difference could be observed before and after swimming- ($P = 0.190$) or running-based ($P = 0.264$) training.

modification of the transcriptome of activated cells, as previously reported in a study of running-induced adaptations in rats showing that only the subpopulation of motoneurons of small soma area displayed an adaptation of their electrophysiological properties (Beaumont & Gardiner, 2002). According to our present results, it can be assumed that this neuronal subpopulation probably corresponds to the motoneurons specifically activated by the running exercise. In the specific case of ALS, the transcriptome modification of the selectively activated motoneuron may lead to an efficient protection against degeneration.

An alternative and non-exclusive mechanism that could be suggested to explain the specific neuroprotection induced by the swimming-based exercise implies an intrinsic modification of the energy metabolism in recruited muscles. On the one hand, the energy metabolism was shown to be highly dysfunctional in the whole organism of ALS mice (Dupuis *et al.* 2004; Fergani *et al.* 2007). On the other hand, the muscle might be a primary target site for ALS (Dobrowolny *et al.* 2008). In addition, the neuromuscular disruption, especially the post-synaptic cleft, appeared as the most prominent event that induces motoneuron death (Frey *et al.* 2000; Fischer *et al.* 2004). Thus, a strength training programme would modify the metabolism of the whole organism, more particularly in the muscle, where the swimming-induced preferential utilization of the glycolytic metabolism would entail a decrease in the reactive oxygen species (ROS) production that could be highly relevant in the ALS context of SOD1 mutation. Accordingly, a running-based training might preferentially use the aerobic metabolism that could worsen the ALS phenotype in particular conditions, such as those used by Mahoney *et al.* (2004). This hypothesis is substantiated by recent evidence suggesting beneficial effects of ROS reduction for skeletal muscles specifically expressing the mutated SOD1(G93A) protein (Dobrowolny *et al.* 2008).

Furthermore, we reported here, for the first time, that exercise impacts on all neural cell distribution in ALS spinal cord with an efficiency dependent on the nature of the exercise. Only the swimming-based training was able to limit the ALS-induced astrogliosis, reducing both proliferation and hypertrophic processes. Importantly, mutant SOD1 damage in astrocytes was recently shown to accelerate ALS disease progression (Yamanaka *et al.* 2008). Our data are indicative of a strong relationship between neuroprotection rate and astrocyte preservation, suggesting that the swimming-based training promotes cell survival not only on the motoneuron, but also on its surrounding cellular environment resulting in the maintained integrity of functional neuronal circuits. We also observed that the swimming-based training specifically promoted a significant maintenance of the oligodendrocyte population, which displayed a 30% loss

in sedentary and running ALS mice. While the role of oligodendrocytes in motoneuron and axonal degeneration in ALS remains elusive, a significant loss of large myelinated fibres in the corticospinal tract and ventral roots was observed in human ALS (Delisle & Carpenter, 1984). Furthermore, myelin degradation in endstage mice has furthermore been observed in the SOD1(G93A) model (Neusch *et al.* 2007). It is thus tempting to speculate that the corticospinal fibres involved in the neuronal network specifically activated by the swimming-based training are also protected. In contrast to the differentiated neural cells, neurons and glia, the neural progenitor cell (NPCs) proliferation, which was enhanced in ALS spinal cord, as previously described (Chi *et al.* 2006; Juan *et al.* 2007), was strongly inhibited by both running and swimming programmes. The fact that both exercises have the same impact on the exercise-induced loss of NPCs suggested a common mechanism, probably associated with the emission of a diffusible factor.

The importance of physical exercise in maintaining nervous system health and function has consistently emerged as a key factor of plasticity and cell survival but the mechanisms underlying the exercise-induced benefits still remain unclear. The present data strongly suggest that some of the exercise effects are specifically and directly exerted on activated motoneurons which probably adapt their proteome, becoming thus selectively more resistant to apoptosis. This concept has been recently substantiated in a spinal-muscular-atrophy model mouse in our laboratory (Biondi *et al.* 2008). Thus, analysing the molecular response of activated motoneurons to exercise and, more precisely, the modulation and activation of the cell-surface receptors is most likely to constitute a milestone in discovering relevant means of preventing motoneuron death in ALS.

References

- Beaumont E & Gardiner P (2002). Effects of daily spontaneous running on the electrophysiological properties of hindlimb motoneurons in rats. *J Physiol* **540**, 129–138.
- Biondi O, Grondard C, Lécolle S, Deforges S, Pariset C, Lopes P, Cifuentes-Diaz C, Li H, della Gaspera B, Chanoine C & Charbonnier F (2008). Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* **28**, 953–962.
- Boillée S, Vande Velde C & Cleveland DW (2006). ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* **52**, 39–59.
- Carri MT, Grignaschi G & Bendotti C (2006). Targets in ALS: Designing multitarget therapies. *Trends Pharmacol Sci* **27**(5), 267–273.
- Carro E, Nuñez A, Busiguina S & Torres-Aleman I (2000). Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci* **20**, 2926–2933.

- Carro E, Trejo JL, Busiguina S & Torres-Aleman I (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci* 21, 5678–5684.
- Chi L, Ke Y, Luo C, Li B, Gozal D, Kalyanaraman B & Liu R (2006). Motor neuron degeneration promotes neural progenitor cell proliferation, migration, and neurogenesis in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Stem Cells* 24, 34–43.
- Delisle MB & Carpenter S (1984). Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 63, 241–250.
- Dietrich WD, Atkins CM & Bramlett HM (2009). Protection in animal models of brain and spinal cord injury with mild to moderate hypothermia. *J Neurotrauma* 26, 301–312.
- Dobrowolny G, Aucello M, Rizzuto E, Beccafico S, Mammucari C, Boncompagni S, Belia S, Wannenes F, Nicoletti C, Del Prete Z, Rosenthal N, Molinaro M, Protasi F, Fanò G, Sandri M, & Musarò A (2008). Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab* 8, 425–436.
- Dupuis L, Oudart H, René F, Gonzalez de Aguilar JL & Loeffler JP (2004). Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11159–11164.
- Fergani A, Oudart H, Gonzalez De Aguilar JL, Fricker B, René F, Hocquette JF, Meininger V, Dupuis L & Loeffler JP (2007). Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Lipid Res* 48, 1571–1580.
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA & Glass JD (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185, 232–240.
- Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W & Caroni P (2000). Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* 20, 2534–2542.
- Ghandour MS, Parkkila AK, Parkkila S, Waheed A & Sly WS (2000). Mitochondrial carbonic anhydrase in the nervous system: expression in neuronal and glial cells. *J Neurochem* 75, 2212–2220.
- Grondard C, Biondi O, Pariset C, Lopes P, Deforges S, Lécalle S, Gaspera BD, Gallien CL, Chanoine C & Charbonnier F (2008). Exercise-induced modulation of calcineurin activity parallels the time course of myofibre transitions. *J Cell Physiol* 214, 126–135.
- Hall ED, Oostveen JA & Gurney ME (1998). Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* 23, 249–256.
- Heath PR & Shaw PJ (2002). Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 26, 438–458.
- Hegedus J, Putman CT, Tyreman N & Gordon T (2008). Preferential motor unit loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 586, 3337–3351.
- Juan L, Dawei Z & Julie AD (2007). Increased number and differentiation of neural precursor cells in the brainstem of superoxide dismutase 1(G93A) (G1H) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 29, 204–209.
- Kaspar BK, Frost LM, Christian L, Umapathi P & Gage FH (2005). Synergy of insulin-like growth factor-1 and exercise in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57, 649–655.
- Kirkinezos IG, Hernandez D, Bradley WG & Moraes CT (2003). Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 53, 804–807.
- Liebetanz D, Hagemann K, von Lewinski F, Kahler E & Paulus W (2004). Extensive exercise is not harmful in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 20, 3115–3120.
- Mahoney DJ, Rodriguez C, Devries M, Yasuda N & Tarnopolsky MA (2004). Effects of high-intensity endurance exercise training in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 29, 656–662.
- Neusch C, Bähr M & Schneider-Gold C (2007). Glia cells in amyotrophic lateral sclerosis: new clues to understanding an old disease? *Muscle Nerve* 35, 712–724.
- Rosen DR (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 364, 362.
- Shefner JM, Reaume AG, Flood DG, Scott RW, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Upton-Rice M & Brown RH Jr (1999). Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy. *Neurology* 53, 1239–1246.
- Veldink JH, Bar PR, Joosten EA, Otten M, Wokke JH & van den Berg LH (2003). Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscul Disord* 13, 737–743.
- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H & Cleveland DW (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11, 251–253.

Author contributions

S.D. conducted, designed and analysed the majority of experiments. J.B. and O.B. conducted the Western blot experiments. C.G. designed, and conducted partly, the training programme and the behavioural analyses. S.L. and C.P. assisted in the majority of experiments and C.P. helped in writing the manuscript. P.L. and P.P.V. helped in the analysis of behaviour data and P.L. helped in writing the manuscript. C.C. helped in the analysis of muscle data. F.C. supervised the project and wrote the manuscript.

Acknowledgments

The authors wish to thank C. L. Gallien for comments and advice, V. Mouly for the muscle antibodies and Q. Y. Zheng for helping in the animal model selection. This project was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM). O.B. and C.G. are the recipients of student fellowships from the Ministère de la Recherche et de la Technologie.

8.2. Conclusions de l'article 4

Dans notre étude, seul l'entraînement à la nage, un exercice physique de forte intensité recrutant préférentiellement les unités motrices rapides, a un effet bénéfique sur le développement de la pathologie dans le modèle murin SOD1 G93A mimant la SLA. A l'inverse, l'entraînement à la course, un exercice physique d'intensité plus modérée recrutant préférentiellement les unités motrices lentes, n'a pas d'effet.

Ainsi, la nage allonge la durée de vie de ces souris mimant la SLA de 26 jours en moyenne, tout en préservant leurs capacités motrices. De plus, cet entraînement retarde l'apparition des premiers symptômes de 16 jours en moyenne. Ce qui fait de la nage une des stratégies thérapeutiques les plus efficaces rapportées à ce jour dans ce modèle souris.

Au niveau du muscle, l'entraînement à la nage préserve les trois muscles étudiés. Il limite l'aplasie, l'atrophie et maintient le phénotype musculaire. Ainsi, il lutte contre les transitions des fibres IIb/IIx vers IIa et I induisant un phénotype plus lent dans les muscles rapides. L'entraînement à la course, quant à lui, engendre également quelques effets bénéfiques sur les muscles des souris mimant la SLA. Il limite l'atrophie dans les trois muscles étudiés. Dans le *tibialis*, il limite également l'aplasie et les transitions des fibres rapides vers un phénotype plus lent. Cependant, il aggrave le phénotype musculaire du plantaris. En effet, il augmente les transitions des fibres IIb vers IIx et induit un phénotype musculaire encore plus lent que chez les souris sédentaires mimant SLA.

Au niveau de la moelle épinière, seul l'entraînement à la nage limite la perte des motoneurones induite par la SLA, en limitant l'apoptose, notamment au niveau des colonnes motrices. Cette protection touche préférentiellement les motoneurones intermédiaires qui ont une surface de soma comprise entre 500 et 700 μm^2 . De plus, l'entraînement à la nage limite significativement la prolifération et l'activation des astrocytes et de NPCs induites par la SLA. De même, il maintient la population d'oligodendrocytes fortement diminuée au niveau des cornes ventrales chez les souris mimant la SLA sédentaires.

Ces résultats suggèrent que la neuroprotection induite par l'exercice physique chez les souris SLA est dépendant du type d'exercice physique pratiqué et non pas de l'intensité de l'exercice. En effet, l'entraînement à la nage active les unités motrices les plus rapides, sélectivement atteintes dans la SLA, et déclenche des mécanismes neuroprotecteurs. Deux hypothèses, ne s'excluant pas l'une de l'autre, peuvent expliquer ce phénomène. Soit la nage induirait des adaptations moléculaires intrinsèques dans les motoneurones de large soma et le maintien de ces derniers induirait, à leur tour, la protection des muscles et des cellules non-neuronales environnantes. Soit, la sollicitation des fibres musculaires rapides de type IIb et IIx par la nage protégerait les muscles des modifications phénotypiques et métaboliques induites par la SLA. Ainsi, l'adaptation moléculaire intrinsèque des fibres musculaires rapides engendrerait une neuroprotection, grâce à la stabilisation des jonctions neuromusculaires rapides.

9. ARTICLE 5

Lithium enhances remyelination of peripheral nerves

**Martin Belle^{a,1}, Joelle Makoukji^{a,1}, Delphine Meffre^a,
Ruth Stassart^b, Julien Grenier^a,
Ghjuvan'Ghjacumu Shackelford^a, Robert Fledrich^b,
Cosima Fonte^c, **Julien Branchu^a**, Marie Goulard^a,
Catherine de Waele^a, Frédéric Charbonnier^a,
Michael W. Sereda^{b,d}, Etienne-Emile Baulieu^c,
Michael Schumacher^c, Sophie Bernard^a
et Charbel Massaad^a**

¹ M.B and J.M. ont contribué de manière égale à ce travail.

^a Unité Mixte de Recherche 8194, Centre National de la Recherche Scientifique, Centre d'Etude de la Sensori Motricité, University Paris Descartes, 75270 Paris Cedex 06, France.

^b Department of Neurogenetics, Max Planck Institute of Experimental Medicine, 37075 Goettingen, Germany.

^c Unité Mixte de Recherche 788, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut Fédératif de Recherche de Bicêtre 93, University Paris-Sud 11, 94276 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France.

^d Department of Clinical Neurophysiology, University of Goettingen, 37075 Goettingen, Germany.

9.1. Introduction à l'article 5

Effets du chlorure de lithium sur la remyélinisation après lésion *in vivo*.

La myéline est essentielle pour la conduction des influx nerveux. Les gènes régulant le phénomène de myélinisation, tels que *Myelin Protein Zero (MPZ)* et *Peripheral Myelin Protein 22 (PMP 22)*, sont hautement stimulés pendant la période postnatale. Par la suite, ils sont faiblement exprimés afin de renouveler et maintenir la gaine de myéline. Dans le système nerveux périphérique, les cellules de Schwann sont en charge de la myélinisation.

Il a été constaté lors de lésions de nerfs, que ces gènes étaient de nouveau stimulés pour initier une remyélinisation. Cependant, dans la plupart des cas, la régénération nerveuse n'aboutit pas et génère des réponses immunes aberrantes, des ischémies, des troubles métaboliques...

Il a été démontré au laboratoire que la voie moléculaire Wnt/ β -caténine déclenchait directement l'expression des gènes de la myéline et pouvait faciliter la remyélinisation. Ainsi, l'activation de Wnt inhibe la Glycogène Synthase Kinase 3 (GSK3 β) et empêche donc la dégradation de la β -caténine. Cette dernière entre dans le noyau et régule la transcription des gènes de la myéline en interagissant avec les facteurs de transcriptions T-Cell Factor/Lymphoid-Enhancer Factor (TCF/LEF).

C'est pourquoi, dans ce travail, nous avons évalué les effets du chlorure de lithium, un stabilisateur d'humeur utilisé dans le traitement de troubles bipolaires ou de dépression, qui est capable d'inhiber la GSK3. Nous avons testé ce traitement *in vivo* dans différentes conditions pathologiques : lésion d'un nerf facial ou du nerf sciatique et *in vitro* dans des cultures de cellules de Schwann (MSC80).

Nous avons administré en intrapéritonéal une dose de 50 mg/kg/jour de chlorure de lithium pendant 4 jours à des souris venant de subir une démyélinisation partielle suite à une lésion d'un nerf facial par pincement. En parallèle des souris lésées ont reçu des injections de PBS. Afin d'évaluer l'impact de l'activation *in vivo* du chlorure de lithium, nous avons suivi une approche pluridisciplinaire, associant des analyses comportementales à des analyses cellulaires et moléculaires. En premier lieu, nous avons étudié la vitesse angulaire du battement des vibrisses des différentes souris après lésions. En second lieu, nous avons analysé la structure des nerfs faciaux par microscopie électronique et calculé leur g-ratio (périmètre de l'axone/périmètre de la gaine de myéline). Enfin, nous avons évalué par RT-PCR quantitative l'expression des gènes de la myéline *P0* et *PMP22*. Afin de confirmer ces données, nous avons réalisé les mêmes expériences sur des souris de 8 semaines ayant subi une lésion du nerf sciatique par pincement. Cette fois-ci, les souris étaient traitées pendant 7 jours en ajoutant 0,2% de chlorure de lithium dans leur eau de boisson.

Le décryptage des voies moléculaires induites par le chlorure de lithium a été initié dans des cultures de MSC80. Nous nous sommes focalisés premièrement sur l'expression des gènes et des protéines de la myéline ; deuxièmement, sur l'expression et la localisation de la β -caténine et enfin sur l'occupation des promoteurs de *MPZ* et *PMP22* par les facteurs TCF/LEF. C'est le premier article prouvant que le traitement au chlorure de lithium est bénéfique dans un contexte de remyélinisation.

Pour ma part, j'ai pris en charge les animaux et réalisé les injections de LiCl ou de placebo. De plus, j'ai assisté le Dr. Joelle Makoukji pour les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. Enfin, j'ai effectué l'analyse par western immunoblot du profil de phosphorylation de la protéine AKT dans les MSC80 traitées au Lithium.

Lithium enhances remyelination of peripheral nerves

Joelle Makoukji^{a,1}, Martin Belle^{a,1}, Delphine Meffre^a, Ruth Stassart^b, Julien Grenier^a, Ghjuvan'Ghjaccumu Shackelford^a, Robert Fledrich^b, Cosima Fonte^c, Julien Branchu^a, Marie Goulard^a, Catherine de Waele^a, Frédéric Charbonnier^a, Michael W. Sereda^{b,d}, Etienne-Emile Baulieu^{c,2}, Michael Schumacher^c, Sophie Bernard^a, and Charbel Massaad^{a,2}

^aUnité Mixte de Recherche 8194, Centre National de la Recherche Scientifique, Centre d'Etude de la Sensori Motricité, University Paris Descartes, 75270 Paris Cedex 06, France; ^bDepartment of Neurogenetics, Max Planck Institute of Experimental Medicine, 37075 Goettingen, Germany; ^cUnité Mixte de Recherche 788, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut Fédératif de Recherche de Bicêtre 93, University Paris-Sud 11, 94276 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France; and ^dDepartment of Clinical Neurophysiology, University of Goettingen, 37075 Goettingen, Germany

Contributed by Etienne-Emile Baulieu, December 27, 2011 (sent for review November 24, 2011)

Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) inhibitors, especially the mood stabilizer lithium chloride, are also used as neuroprotective or anti-inflammatory agents. We studied the influence of LiCl on the remyelination of peripheral nerves. We showed that the treatment of adult mice with LiCl after facial nerve crush injury stimulated the expression of myelin genes, restored the myelin structure, and accelerated the recovery of whisker movements. LiCl treatment also promoted remyelination of the sciatic nerve after crush. We also demonstrated that peripheral myelin gene MPZ and PMP22 promoter activities, transcripts, and protein levels are stimulated by GSK3 β inhibitors (LiCl and SB216763) in Schwann cells as well as in sciatic and facial nerves. LiCl exerts its action in Schwann cells by increasing the amount of β -catenin and provoking its nuclear localization. We showed by ChIP experiments that LiCl treatment drives β -catenin to bind to T-cell factor/lymphoid-enhancer factor response elements identified in myelin genes. Taken together, our findings open perspectives in the treatment of nerve demyelination by administering GSK3 β inhibitors such as lithium.

Wnt/ β -catenin | neuropathy

Myelin is essential for the rapid conduction of axonal impulses. Myelination, elicited in peripheral nerves by Schwann cells, is a complex and fine-tuned process. Peripheral myelin gene expression [Myelin Protein Zero (MPZ) and Peripheral Myelin Protein 22 (PMP22)] is tightly regulated (1). Myelin gene expression is stimulated during the myelination process, which occurs in rodents between postnatal days 1 and 21 (2). Afterward, those genes are expressed at lower levels, sufficient to maintain myelin turnover. They are restimulated after nerve injuries to initiate remyelination (3).

Peripheral nerve injuries are frequent, and the functional outcomes are often not satisfactory. Demyelination can occur as a result of neuronal or Schwann cell injury and is usually accompanied or followed by axonal degeneration. Acquired neuropathies may be caused by aberrant immune responses, local injury, ischemia, metabolic disorders, toxic agents, or viral infections. To date, few therapeutic treatments are available. They are mostly based on anti-inflammatory agents.

Few cellular signals are known to directly regulate the expression of myelin genes. For instance, we have shown that the Wnt/ β -catenin signaling pathway is a direct driver of myelin gene expression (4). Wnt activation inhibits glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) enzyme and prevents β -catenin degradation. The stabilized β -catenin is translocated into the nucleus, where it regulates gene transcription by interacting with transcription factors called T-cell factor/lymphoid-enhancer factors (TCF/LEF or TCFs).

Lithium is an enzymatic inhibitor of GSK3 β , and mimics the Wnt/ β -catenin signaling pathway. This drug is widely used as a long-term mood stabilizer in the treatment of bipolar and depressive disorders (5). Growing evidence demonstrates that lithium has neuroprotective (6) and antiapoptotic (7) properties, and can therefore be used as a treatment in several neurodegenerative diseases [e.g., Huntington disease (8), Alzheimer's disease (9), Parkinson disease (10)] and in experimental autoimmune encephalomyelitis (11).

In this study, we report several lines of evidence that the inhibitors of GSK3 β (LiCl and SB216763) enhance peripheral myelin gene expression in vitro and in vivo via the binding of β -catenin to TCF/LEF transcription factors present in PMP22 and MPZ promoters. Most strikingly, LiCl administration to mice after a crush of the facial nerve, which provokes paralysis of the whiskers, elicited a rapid recovery of their movements. This recovery is concomitant with the stimulation of myelin gene expression and the restoration of the myelin sheath structure around the axons. LiCl also provoked the remyelination of axons after sciatic nerve crush. Consequently, our findings open perspectives in the treatment of demyelinating diseases by administering GSK3 β inhibitors such as lithium.

Results

LiCl Administration Accelerates Functional Recovery and Ameliorates Phenotype of Facial Nerve After Nerve Injury. Our aim is to assess the outcome of the administration of LiCl, a widely used inhibitor of GSK3 β (IC₅₀, 10 mM), after motor nerve injury. Therefore, we developed in mice a model of facial nerve crush that provokes a local demyelination and complete subsequent palsy of the ipsilateral (crushed) whiskers, as well as absence of ipsilateral blink reflex. The left facial nerve was crushed whereas the right one was left intact to serve as a control (Fig. 1A). We then analyzed by means of WhiskerWatcher device the angular velocity of the ipsilateral whisker movements before and after the crush at different postlesion time points [day postinjury 3 (DPI3), DPI8, and DPI14] in two groups of animals: a group treated with LiCl (i.p. injection, 50 mg/kg/d during 4 d after nerve crush) and a group treated with PBS solution (i.e., placebo) during a similar period (Fig. 1A).

The mean angular velocity of the whiskers was 56.44°/s in normal animals, and it decreased to 0.2°/s at DPI3 in nerve-crushed animals, indicating a dramatic alteration of whisker movements after facial nerve injury (Fig. 1B). The placebo-treated animals recovered slowly: at DPI8, the velocity was 7.96°/s, and at 14 d, the whisker movements were still below normal levels (44.99°/s vs. 56.44°/s for normal animals). Interestingly, the i.p. LiCl administration after the facial nerve crush accelerated the functional recovery during the first 8 d after lesion creation. The angular velocity was significantly improved after 3 d of treatment with LiCl: 3.48°/s with LiCl vs. 0.2°/s with placebo. At 8 d, we also observed an improvement in the movements of the whiskers, which became almost normal (43.08°/s with LiCl vs. 7.96°/s with placebo). At 14 d, we can consider that the animal recovered

Author contributions: R.S., C.d.W., F.C., M.W.S., S.B., and C.M. designed research; J.M., M.B., D.M., R.S., J.G., G.S., R.F., C.F., J.B., M.G., C.d.W., and S.B. performed research; J.M., C.d.W., F.C., M.W.S., M.S., S.B., and C.M. analyzed data; and E.-E.B., M.S., and C.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

¹J.M. and M.B. contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed. E-mail: etienne.baulieu@inserm.fr or charbel.massaad@parisdescartes.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1121367109/-DCSupplemental.

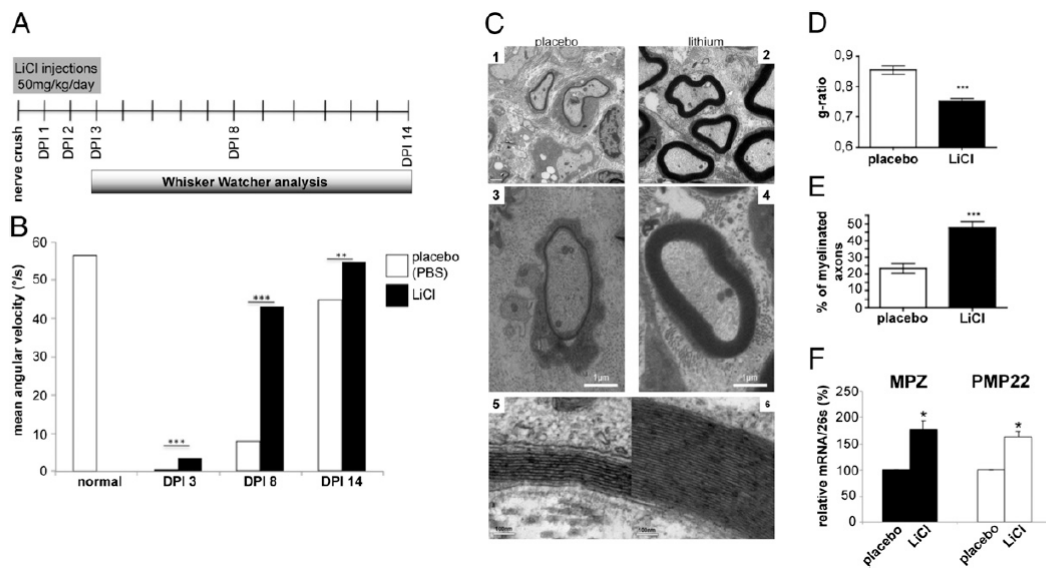


Fig. 1. Effect of LiCl administration on functional recovery of whiskers and phenotype of the facial nerve after nerve crush. (A) Nerve crush of the left facial nerve was performed in 8-wk-old mice. One group received four i.p. injections of LiCl (50 mg/kg/d) directly after the nerve crush during 4 d. The other group received PBS solution injection as a placebo (Pl). Normal animals (control) did not undergo nerve crush. (B) The mean angular velocity of the whisker movements of all animals was analyzed by means of WhiskerWatcher software at DPI3, DPI8, and DPI14. Results are expressed in degrees per second and represent the mean of six animals per group; the angular velocity of the whiskers of each animal was analyzed three times (*** $P < 0.005$, Kruskal–Wallis test). (C) Eight days after the facial nerve crush (DPI8), the facial nerve was isolated. Ultrathin cross-sections were prepared from epon-embedded adult facial nerves and stained for myelin. 1 and 2, Low-magnification EM images of a section of facial nerve. (Scale bar: 2 μ M.) 3 and 4, High-magnification EM images of a representative axon. (Scale bar: 1 μ M.) 5 and 6, High-magnification EM images of myelin layers. (Scale bar: 100 nm.) (D) Myelin thickness was estimated by g-ratio determination by using EM images obtained from facial nerves (12 images per animal, three animals per condition). Data are means \pm SEM. (E) The percentage of myelinated axons per square micrometer was calculated by using EM images. Three animals per condition were used. Data are means \pm SEM. (F) Facial nerves were dissected at DPI3. Quantitative RT-PCR experiments were performed by using primers recognizing PMP22 and MPZ genes. 26S and GAPDH RNA were used to normalize quantitative RT-PCR (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ by Mann–Whitney test vs. control).

completely because we did not have any significant mean angular velocity difference between the normal animals (56.44°/s) and LiCl-treated animals (54.78°/s).

Afterward, we analyzed the structure of facial nerve at DPI8 by using EM. The crushed nerves of LiCl-treated mice exhibited a thicker myelin sheath (Fig. 1C), suggesting nerve remyelination. This assumption was reinforced by the calculation of the g-ratio (i.e., axon diameter/myelin sheath diameter). The g-ratio of placebo-treated animals (0.84 ± 0.01) was significantly higher than that of LiCl-treated animals (0.75 ± 0.01 ; Fig. 1D). Furthermore, the percentage of myelinated axons doubled after LiCl treatment (23.31 ± 3.05 with placebo vs. 47.64 ± 3.69 with LiCl; $P < 0.001$; Fig. 1E). We analyzed by quantitative RT-PCR the expression of myelin genes. The administration of lithium enhanced by twofold the transcripts of MPZ and PMP22 at DPI3 (Fig. 1F). At DPI8, LiCl did not enhance the expression of myelin genes. In conclusion, our results indicate that LiCl accelerates the functional recovery of whisker movements after facial nerve crush injury and improves the nerve phenotype.

LiCl Administration Enhances Remyelination of Sciatic Nerve After Nerve Injury. To confirm the remyelinating effect of LiCl on another peripheral nerve, we performed sciatic nerve crush on 8-wk-old mice. Two weeks after the nerve crush, we treated the animals with LiCl (0.2%) in drinking water during 7 d (Fig. 2A). The administration of LiCl in drinking water is a more relevant clinical setting, as patients receive lithium orally. One week later, the animals were killed, and we performed real-time PCR to analyze the effect of LiCl on myelin gene expression, as well as histological study to observe the effect of LiCl administration on nerve shape. As expected, LiCl treatment was shown to enhance the

mRNA expression of MPZ (threefold) and PMP22 (sixfold; Fig. 2B) compared with placebo-treated mice. Furthermore, the crushed nerves of LiCl-treated mice exhibited a thicker myelin sheath (Fig. 2C), suggesting nerve remyelination. This observation was confirmed by the fact that the g-ratio of LiCl-treated mice was lower than that of placebo-treated ones (Fig. 2D). LiCl-treated mice did not show any alteration in the axon diameter compared with controls. Taken together, our observations demonstrate an increase of myelin sheath diameter around the axons of sciatic nerve in LiCl-treated mice vs. placebo-treated ones.

Pharmacological Inhibition of GSK3 β Activates Myelin Gene Expression. We incubated Schwann cell line (MSC80) with LiCl (10 mM) to examine whether LiCl has a direct impact on Schwann cells and on myelin genes. LiCl did not elicit any significant effect on MPZ or PMP22 transcripts after 1–8 h of treatment, but this drug stimulated MPZ transcript by threefold after 24 h of incubation (Fig. 3A). Interestingly, LiCl stimulation lasted longer. When MSC80 cells were incubated with LiCl for 48 h and 72 h, we observed a 20-fold and 54-fold stimulation of MPZ transcript, respectively (Fig. 3A). Stimulation of PMP22 transcript (2.5-fold) was also observed, but to a lesser extent than for MPZ (Fig. 3A).

These results were confirmed at the protein levels. As shown in Fig. 3B, MPZ protein level was enhanced by 14 fold after 24 h and by 13 fold after 48 h of LiCl treatment. This observation is in accordance with the increase of MPZ transcript. Nevertheless, MPZ protein stimulation decreased after 72 h of treatment with LiCl (sevenfold stimulation). Such a discrepancy between MPZ transcript overexpression and protein decrease has already been described (12, 13). We also observed that the increase in PMP22

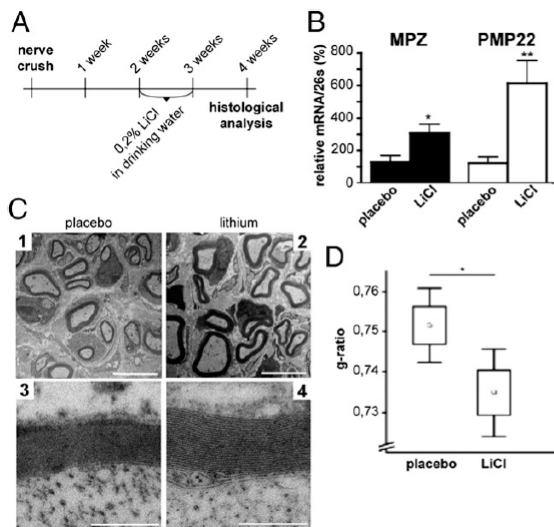


Fig. 2. Effect of LiCl on the remyelination of sciatic nerve after nerve crush. (A) Nerve crush of the right sciatic nerve was performed in 8-wk-old mice. Two weeks after nerve crush, one group received 0.2% LiCl for 7 d. All animals were killed 4 wk after nerve crush, and their sciatic nerves were analyzed. (B) Sciatic nerves distal to the crush were dissected. Quantitative RT-PCR experiments were performed by using primers recognizing MPZ and PMP22. The quantitative RT-PCR was normalized by using 26S RNA (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ by Mann–Whitney test vs. control.) (C) EM images of sciatic nerves 4 wk after crush from placebo- (Pl) and LiCl-treated mice. 1 and 2, Low-magnification EM images of section of sciatic nerve. (Scale bar: 5 μ M.) 3 and 4, High-magnification EM images of myelin layers. (Scale bar: 0.5 μ M.) (D) G-ratio analysis of sciatic nerves from placebo-treated animals ($n = 8$) and LiCl-treated animals ($n = 8$) 4 wk after crush. At least 100 axons per animal were quantified on an EM level.

protein expression was time-dependent: LiCl slightly enhanced PMP22 protein expression at 24 h (1.4 fold), but a clear induction of PMP22 protein was observed after 48 h (3.3 fold) and 72 h (2.3 fold) of treatment with LiCl.

Similarly, LiCl enhanced myelin gene expression in Schwann cell primary cultures. As depicted in Fig. 3C, LiCl at 24 h augmented protein expression of MPZ (1.5 fold) and PMP22 (3.3 fold). LiCl did not further increase MPZ and PMP22 expression after 48 h or 72 h of treatment.

To confirm the implication of GSK3 β in the regulation of myelin genes, we used SB216763, a more potent and selective inhibitor of GSK3 β . MSC80 cells were incubated with SB216763 (10 μ M) during 3 h, 6 h, or 24 h. The expression of MPZ and PMP22 proteins was enhanced after 3 h of SB216763 treatment (1.8 fold and 2.5 fold, respectively) and lasted as long as 24 h (Fig. 3D).

LiCl Enhances Expression and Nuclear Localization of β -Catenin Without Affecting Akt Signaling. LiCl is an inhibitor of GSK3 β , which is at the crossroads of several signaling pathways, including Wnt/ β -catenin and Akt pathways. For that reason, we looked for the signaling pathway affected in a Schwann cell line after incubation with LiCl. LiCl treatment did not alter the phosphorylation status of Akt in MSC80 cells, ruling out the intervention of Akt (Fig. 4A). However, LiCl stimulated β -catenin protein expression by fourfold in MSC80 cells (from 24 h until 72 h of treatment; Fig. 4B) and in primary Schwann cells (24 h; Fig. 4C). SB216763 also increased the expression of β -catenin after 3 h of treatment until 24 h (Fig. 4D). The mimicking of Wnt/ β -catenin pathway by LiCl was also confirmed by the 15-fold stimulation of a TOP-FLASH luciferase (luc) construct by LiCl (Fig. 4E). This

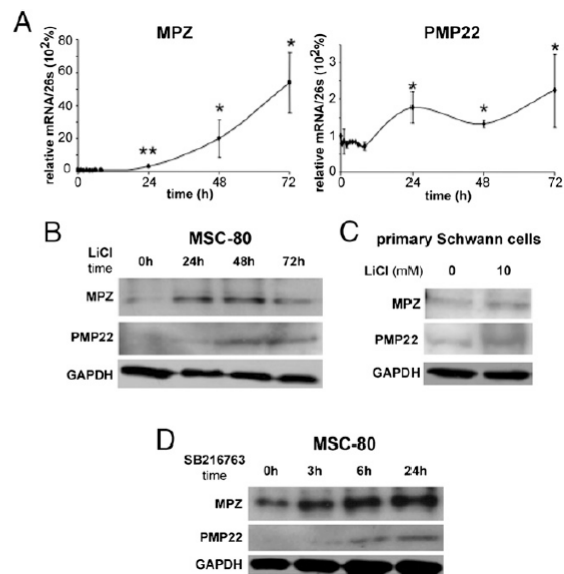


Fig. 3. Effect of LiCl on the expression of MPZ and PMP22 in MSC80 cells and in primary Schwann cells. MSC80 cells were incubated with LiCl (10 mM) from 1 h to 72 h. (A) Total RNA was extracted, and quantitative real-time PCR experiments were performed by using primers recognizing MPZ or PMP22. RT-PCR was normalized by using 26S RNA. Results represent the mean \pm SEM of four independent experiments (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ by Mann–Whitney test vs. control.) (B) Proteins were extracted and Western blots were performed by using anti-MPZ or anti-PMP22 antibodies. (C) Primary Schwann cells were treated with LiCl (10 mM) for 24 h. (D) MSC80 cells were treated with SB216763 (10 μ M) for 3, 6, or 24 h. Proteins were extracted and Western blots were performed by using anti-MPZ or anti-PMP22 antibodies. GAPDH was used to normalize the Western blots. Results were reproduced at least in three independent experiments.

promoter contains several binding sites for TCF/LEF transcription factors that are downstream of Wnt/ β -catenin signaling pathway. LiCl also enhances the expression of cyclin D1, which is a Wnt/ β -catenin target gene (Fig. S1).

Confocal microscopy analysis revealed that, in control MSC80, the majority of β -catenin was localized in the plasma membrane as well as in the cytoplasm. Only a small fraction was nuclear (Fig. 4F and G). After a 24-h treatment with LiCl, a part of β -catenin was transferred into the nucleus. After 48 h and 72 h of LiCl treatment, β -catenin was localized in the cytoplasm, the cell membrane, and the nucleus (Fig. 4G). Thus, incubation of MSC80 cells with LiCl triggers the relocalization of a fraction of β -catenin into the nucleus.

Taken together, these results demonstrate that, in Schwann cells, LiCl is able to mimic the Wnt/ β -catenin signaling pathway (14) without affecting Akt phosphorylation.

LiCl Promotes β -Catenin Recruitment on TCF/LEF Binding Sites on Myelin Gene Promoters. We investigated the incidence of LiCl treatment on the regulation of myelin gene promoters by transfecting MSC80 cells with MPZ-luc or PMP22-luc constructs and incubating them with LiCl (10 mM) during 24 h. As shown in Fig. 5A, LiCl enhanced by fourfold and threefold the transactivation of MPZ-luc and PMP22-luc constructs, respectively. LiCl did not further increase MPZ-Luc or PMP22-Luc promoter activities after 48 h or 72 h of incubation.

We performed ChIP experiments to identify the molecular targets of LiCl at the level of MPZ and PMP22 promoters. We have already shown that MPZ and PMP22 promoters contain

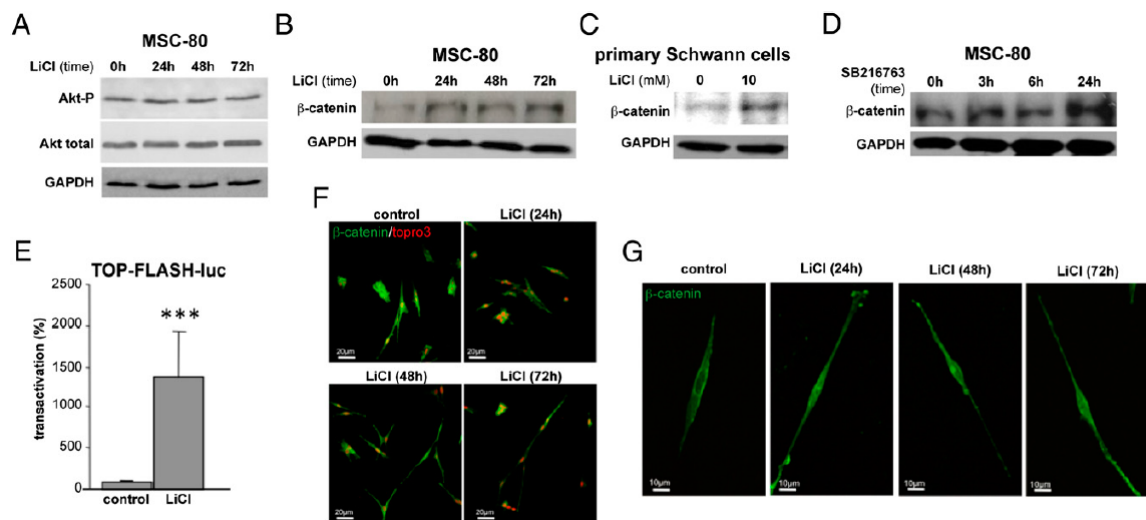


Fig. 4. Effect of LiCl and SB 216763 on Akt and canonical Wnt pathway in MSC80 cells and in primary Schwann cells. (A) MSC80 cells were treated with LiCl (10 mM) during 24 h, 48 h, and 72 h. Western blots were performed by using anti-AktP or anti-Akt total antibodies. GAPDH was used to normalize the Western blots. These results were reproduced in three independent experiments. Protein extracts were prepared from MSC80 cells treated with LiCl (10 mM) during 0 h, 24 h, 48 h, and 72 h (B), primary Schwann cells treated with LiCl (10 mM) for 24 h (C), or MSC80 cells treated with SB216763 (10 μM) for 3, 6, or 24 h (D). Western blots were performed by using anti-β-catenin antibody. GAPDH was used to normalize the Western blots. Those experiments were reproduced at least three times. (E) MSC80 cells were transiently transfected with TOP-FLASH-luc plasmid, then incubated with LiCl (10 mM) for 24 h. β-Gal and luciferase activities were analyzed. Results are expressed as the induction over the basal activity, and they represent the mean ± SEM of at least 11 independent assays performed in duplicate (***) $P < 0.001$ by Mann-Whitney test vs. control). (F) MSC80 cells were incubated in the absence (control) or in the presence of LiCl (10 mM) during 24 h, 48 h, and/or 72 h, and then monitored by confocal microscopy to localize β-catenin (Alexa 488, green) or nuclei (Topro3, red). This experiment was repeated three times, and a typical experiment is presented here. [Scale bars: Upper (low magnification, ×40), 20 μM; Lower (high magnification, ×63), 10 μM.]

active TCF/LEF-binding sites (Fig. 5 B and C) (4). ChIP analysis demonstrated that β-catenin recruitment by TCF/LEF binding domain (localized −8,487/−8,471 bp on the level of the MPZ promoter) was enhanced by 15 fold after 1 h of LiCl treatment. Concerning the PMP22 promoter, we identified a potential binding site of TCF/LEF in position +107/+124. ChIP assays showed that β-catenin recruitment increased by 30 fold after 1 h of incubation with LiCl.

Discussion

GSK3β is emerging as a prominent drug target in the central nervous system (15), in anticancer therapy (16), and in diabetes treatment. Lithium, a well known inhibitor of GSK3β, is commonly used as a mood stabilizer in the treatment of bipolar disorder (17, 18). Recent in vitro and in vivo studies described the effect of lithium in the treatment of acute brain injuries (e.g., ischemia, brain trauma) and in neurodegenerative diseases (e.g., Parkinson disease, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, and Huntington disease) (11, 19). Indeed, lithium has a neuro-protective effect by preventing neuronal death and stimulating neurogenesis (7). For example, in primary neuronal cultures, lithium protected neurons from apoptosis induced by excessive glutamate (20). Low doses of lithium were also shown to decrease striatal lesion induced by an NMDA receptor agonist in a rat excitotoxic model of Huntington disease (8) and also to reduce *tau* hyperphosphorylation (i.e., in Alzheimer disease) (9) through inhibiting GSK3β, Akt (21), and protein kinases A (22) and C pathways (23). Lithium is not only known to decrease brain damage, but also to promote survival, proliferation, and neuronal differentiation of neural progenitor cells in vitro and after transplantation for the treatment of spinal cord injury (24). Lithium treatment enhances the expression of cell survival genes like Bcl-2, BDNF, Hsp70, β-catenin, and CREB (20, 25, 26). This

drug also attenuates the expression or activity of proapoptotic genes like Bax, caspase, cytochrome *c*, and β-amyloid peptide. In addition, lithium has an anti-inflammatory potential in the brain (27). Lithium reduces microglia activation and leukocyte infiltration in the spinal cord in EAE, suggesting its possible use in multiple sclerosis (11). Nevertheless, the effect of LiCl or other GSK3β inhibitors on remyelination of the peripheral nervous system is still unexplored.

Therefore, we performed nerve crush on the facial nerve and sciatic nerve to study the effect of LiCl on remyelination after myelin injuries. We have tested two different peripheral nerves to demonstrate that the beneficial effects of lithium on remyelination are not limited a specific type of nerve. We have also used two different protocols. For the facial nerve, mice were directly treated after the lesion with i.p. injections of LiCl. For the sciatic nerve, we administered LiCl 14 d after lesion to verify its effects on myelination. Indeed, at this stage of regeneration, the remyelination of the regrowing axons has started and in addition, myelin debris have been removed by macrophages and Schwann cells, allowing to precisely evaluate the formation of new myelin. In this experiment, we also tested the efficacy of orally administered LiCl (added to drinking water) because patients receive lithium orally.

In the model of facial nerve crush, LiCl administration accelerated the recovery of whisker movement in injured animals. Eight days after the crush, lithium-treated animals had practically totally recovered, whereas placebo-treated ones still had a palsy of the whiskers. LiCl greatly ameliorated the phenotype of the lesioned nerve: it enhanced the expression of myelin genes and increased the thickness of the myelin sheaths, as indicated by the decrease of the g-ratio. Consequently, after LiCl administration, the number of myelinated axons was doubled. We obtained comparable results in another peripheral nerve, the sciatic nerve. LiCl administration

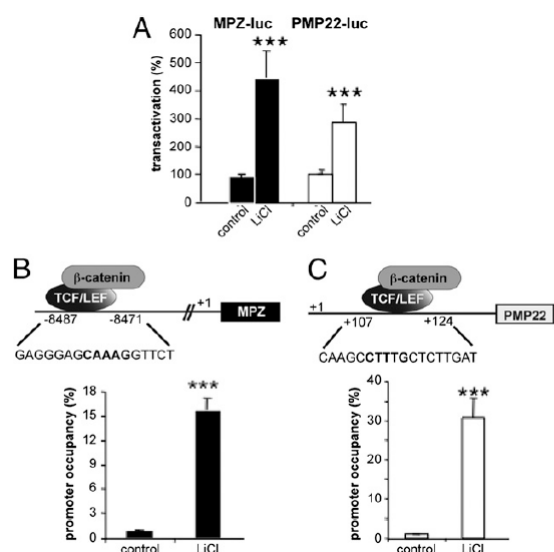


Fig. 5. Effect of LiCl on MPZ and PMP22 promoters. (A) MSC80 cells were transiently transfected with MPZ-Luc or PMP22-Luc plasmids and then incubated with LiCl (10 mM) for 24 h. Luciferase and β -gal activities were analyzed. Results are expressed as induction vs. basal activity, and they represent the mean \pm SEM of at least 11 independent assays performed in duplicate ($***P < 0.001$ by Mann-Whitney test vs. control). Recruitment of β -catenin on the levels of MPZ (B) and PMP22 (C) promoters. LEF/TCF binding sites were localized in MPZ and PMP22 promoters (4). Cells were treated with LiCl (10 mM) for 1 h and then subjected to ChIP analysis by using control or anti- β -catenin antibody. Quantitative real-time PCR was performed to detect MPZ and PMP22 promoter regions including LEF/TCF binding elements ($***P < 0.001$ by Tukey post-hoc test after one-way ANOVA vs. control).

in drinking water ameliorated sciatic nerve phenotype, increased myelin sheaths thickness, and enhanced myelin gene expression. These encouraging results demonstrate that the administration of lithium either by injection or orally has beneficial effects in the treatment of myelin injuries.

Does LiCl exert its positive effects on Schwann cells? To address this question, we performed *in vitro* experiments in primary cultures of Schwann cells and in the MSC80 cell line. LiCl increased cyclin D1 expression (Wnt/ β -catenin target gene; Fig. S1) but did not augment the proliferation of MSC80 (Fig. S2). After 24 h, LiCl stimulated MPZ and PMP22 promoters, transcripts, and proteins. Interestingly, in MSC80 cells, LiCl enhanced myelin gene expression after 48 h and 72 h of treatment. We obtained a robust stimulation of MPZ mRNA (20 fold at 48 h and 50 fold at 72 h). The stimulation was lesser at the level of the PMP22 protein, probably because of posttranscriptional regulation of PMP22 mRNA. The kinetic of stimulation of MPZ and PMP22 by two distinct GSK3 β inhibitors (SB216763 and LiCl) was different. Whereas SB216763 rapidly stimulated MPZ (i.e., after 1 h of treatment), LiCl activated MPZ expression only after 24 h. This discrepancy may result from the fact that these drugs vary in their potency to inhibit GSK3 β . Actually, LiCl has an IC_{50} of 10 mM, whereas SB216763 is a more potent and selective inhibitor (IC_{50} of 34 nM). The treatment of cells with LiCl did not trigger any modification in the phosphorylation state of Akt, but enhanced the expression and nuclear localization of β -catenin and stimulated a TCF/LEF-containing promoter (TOP-FLASH). Therefore, the stimulation of MPZ and PMP22 is not a result of the activation of the Akt pathway but rather of β -catenin/TCF signaling. The nuclear stabilized β -catenin binds to TCF/LEF transcription factors present in the vicinity of PMP22 and MPZ

promoters, as suggested by ChIP assays. Those observations are in accordance with our previous results that showed that the Wnt/ β -catenin pathway is essential for myelin gene expression (4).

In conclusion, lithium is known to exert several beneficial effects on axonal regeneration and also has remyelinating effects. Therefore, this molecule could constitute a potential treatment of nerve injuries in which axonal lesions and demyelination coexist. Our results provide evidence that the GSK3 β could be considered as an important actor in the expression of myelin genes, and they open approaches in the treatment of nerve injuries that use inhibitors of GSK3 β such as lithium.

Materials and Methods

Cell Culture. Mouse Schwann cells (MSC80 cells) were transiently transfected by using Effecten reagent (Qiagen) as described by Makoukji et al. (13). Sixteen hours after transfection, the medium was replaced by DMEM with or without LiCl or SB216763. Primary Schwann cells were isolated from the sciatic nerves as described by Tawak et al. (4).

Plasmids and Chemicals. MPZ-luc was provided by G. Lemke (Salk Institute for Biological Studies, San Diego, CA), PMP22-luc by P. Patel (Baylor College of Medicine, Houston, TX), and TOP-FLASH-luc plasmid by R. T. Moon (University of Washington School of Medicine, Seattle, WA). LiCl and SB216763 were purchased from Sigma-Aldrich.

Semiquantitative RT-PCR Experiments, Western Blot, Immunocytochemistry, and ChIP. Semiquantitative RT-PCR experiments, Western blot, immunocytochemistry, and ChIP were performed as described by Tawak et al. (4), by Makoukji et al. (13), and in *SI Materials and Methods*.

Facial Nerve Crush. *Animals.* Facial nerve crush experiments were performed on 8-wk-old male C57Bl6 mice (Janvier). They were done in accordance with the requirements of the European 7 Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC). Each experiment was made to minimize the number of animals used and the suffering of animals.

Nerve crush and drug treatment. Mice were anesthetized using a mixture of ketamine (0.5 mL) and xylazine (1 mL), and the left facial nerve near its exit from the stylomastoid foramen was exposed and crushed by applying pressure for 5 s by using a forceps on the trunk of the facial nerve. After surgery, the wound site was closed and animals were allowed to recover. Nonoperated mice were used as controls. All of the crushes were made by the same surgeon to minimize the variation of the crush among different animals. Following injury, the animals displayed a unilateral facial palsy with return of some eyelid and whisker movements after 14 d.

Mice received a treatment after the nerve lesion: a 50 mg/kg/d i.p. injection of LiCl ($n = 6$ per group) during 4 d. The control or placebo received an injection of 0.1 M PBS solution. Movements of the whiskers were quantified at the three recovery times (i.e., DPI3, DPI8, and DPI14).

Procedures used with WhiskerWatcher. The quantification of whisker movements was performed one day after the facial nerve crush. For that purpose, a device was fixed under general anesthesia (ketamine/xylazine) to the mouse's skull by using dental cement (SuperBond; Sun Medical). This device restrained head movements and avoided recording parasite movements. The stand is composed of a cylinder in which the mouse is placed and of a rod enabling the fixation of the animal. A silver adhesive foil was then placed on vibrissae of the third rank on the left side. A sensitive camera placed above the vibrissae allowed the detection of all vibrissae movements (WhiskerWatcher; Arrington Research). The mice were stimulated with food or air breeze in the eyes. Every mouse was recorded at least six times each day by WhiskerWatcher software. The data collected corresponded to position Y and position X (providing 2D coordinates of the marker in millimeters), the angle variation of the vibrissae (in degrees), and the angular velocity (in degrees per second).

Sciatic Nerve Crush Injury. Adult 8-wk-old male mice were anesthetized and the right sciatic nerve was crushed by using fine forceps (13-cm smooth needle holder; FST) for 40 s just distal to the sciatic notch. As a control, the contralateral side was exposed but remained uninjured. Following the specified length of time, the mice were killed for immediate collection of tissues for histologic examination or RNA isolation.

Methylene Blue/Azur II Staining and Transmission EM. Sample preparation and EM were performed as described by Makoukji et al. (13) and in *SI Materials and Methods*.

Statistical Analysis. Unless otherwise specified, means of treatment groups were compared with one-way ANOVA. When the ANOVA showed that there were significant differences between the groups, the Tukey test was used to identify the sources of these differences. A *P* value of 0.05 or lower was considered statistically significant. The variations of the angular speed were submitted to statistical analysis by the Kruskal–Wallis test, with results significant at *P* < 0.05.

ACKNOWLEDGMENTS. The authors acknowledge Dr. Alain Schmitt of the Cochin Imaging Facility. This work was funded by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, University Paris Descartes, and the Association Française contre les Myopathies. J.M., M.B., G.S., and J.B. received doctoral fellowships from the French Ministry of Research. D.M. received a postdoctoral fellowship from Neuropole de Recherche Francilien.

- Niemann A, Berger P, Suter U (2006) Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* 8:217–242.
- Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C (2000) Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 61:267–304.
- Slutsky SG, Kamaraju AK, Levy AM, Chebath J, Revel M (2003) Activation of myelin genes during transdifferentiation from melanoma to glial cell phenotype. *J Biol Chem* 278:8960–8968.
- Tawk M, et al. (2011) Wnt/beta-catenin signaling is an essential and direct driver of myelin gene expression and myelinogenesis. *J Neurosci* 31:3729–3742.
- Phiel CJ, Klein PS (2001) Molecular targets of lithium action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:789–813.
- Zhong J, Yang X, Yao W, Lee W (2006) Lithium protects ethanol-induced neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 350:905–910.
- Chuang DM (2005) The antiapoptotic actions of mood stabilizers: Molecular mechanisms and therapeutic potentials. *Ann N Y Acad Sci* 1053:195–204.
- Wei H, et al. (2001) Lithium suppresses excitotoxicity-induced striatal lesions in a rat model of Huntington's disease. *Neuroscience* 106:603–612.
- Noble W, et al. (2005) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6990–6995.
- Youdim MB, Arraf Z (2004) Prevention of MPTP (N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) dopaminergic neurotoxicity in mice by chronic lithium: Involvements of Bcl-2 and Bax. *Neuropharmacology* 46:1130–1140.
- De Sarno P, et al. (2008) Lithium prevents and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 181:338–345.
- Wrabetz L, et al. (2000) P(0) glycoprotein overexpression causes congenital hypomyelination of peripheral nerves. *J Cell Biol* 148:1021–1034.
- Makoukji J, et al. (2011) Interplay between LXR and Wnt/beta-catenin signalling in the negative regulation of peripheral myelin genes by oxysterols. *J Neurosci* 26:9620–9629.
- Hedgepeth CM, et al. (1997) Activation of the Wnt signaling pathway: A molecular mechanism for lithium action. *Dev Biol* 185:82–91.
- Bhat RV, Budd Haerberlein SL, Avila J (2004) Glycogen synthase kinase 3: A drug target for CNS therapies. *J Neurochem* 89:1313–1317.
- Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T (2009) Drug development targeting the glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta)-mediated signal transduction pathway: Inhibitors of the Wnt/beta-catenin signaling pathway as novel anticancer drugs. *J Pharmacol Sci* 109:179–183.
- Gould TD, Chen G, Manji HK (2004) In vivo evidence in the brain for lithium inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Neuropsychopharmacology* 29:32–38.
- Pies R (2002) Combining lithium and anticonvulsants in bipolar disorder: A review. *Ann Clin Psychiatry* 14:223–232.
- Zhong J, Lee WH (2007) Lithium: A novel treatment for Alzheimer's disease? *Expert Opin Drug Saf* 6:375–383.
- Chuang DM (2004) Neuroprotective and neurotrophic actions of the mood stabilizer lithium: Can it be used to treat neurodegenerative diseases? *Crit Rev Neurobiol* 16:83–90.
- Klein PS, Melton DA (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8455–8459.
- Mori S, et al. (1996) Inhibitory effect of lithium on cAMP dependent phosphorylation system. *Life Sci* 59:PL99–PL104.
- Einat H, Yuan P, Szabo ST, Dogra S, Manji HK (2007) Protein kinase C inhibition by tamoxifen antagonizes manic-like behavior in rats: Implications for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Neuropsychobiology* 55:123–131.
- Su H, Chu TH, Wu W (2007) Lithium enhances proliferation and neuronal differentiation of neural progenitor cells in vitro and after transplantation into the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 206:296–307.
- Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 281:1322–1326.
- Sadoul R (1998) Bcl-2 family members in the development and degenerative pathologies of the nervous system. *Cell Death Differ* 5:805–815.
- Basselin M, Villacres NE, Lee HJ, Bell JM, Rapoport SI (2007) Chronic lithium administration attenuates up-regulated brain arachidonic acid metabolism in a rat model of neuroinflammation. *J Neurochem* 102:761–772.

9.2. Conclusions de l'article 5

Nous avons démontré que le traitement par une dose adéquate de chlorure de lithium pouvait être bénéfique dans le cadre de la remyélinisation des nerfs périphériques.

Nous avons observé que le traitement accélérât significativement la récupération fonctionnelle du battement des vibrisses après une lésion d'un nerf facial. Ainsi, 3 jours après le traitement la vitesse angulaire des vibrisses est de 0,2°/s pour les animaux traités au PBS et 3,48°/s pour ceux traités au chlorure de lithium ; à 8 jours, 7,96°/s et 43,08°/s respectivement.

Du point de vue histologique, nous avons constaté que le traitement rétablissait les structures de la gaine de myéline suite à une lésion du nerf facial ou du nerf sciatique. Ainsi, en microscopie électronique, il s'avère que le g-ratio des animaux traités au PBS ($0,84 \pm 0,01$) était significativement plus grand que celui des animaux traités au chlorure de lithium ($0,75 \pm 0,01$). Par ailleurs, les souris traitées au chlorure de lithium ne présentent pas d'altération du périmètre de l'axone comparé aux souris contrôles du même âge.

Du point de vue moléculaire, le traitement augmente de plus de deux fois l'expression des gènes de la myéline *MPZ* et *PMP22* suite au deux types de lésions. Enfin, nous avons démontré *in vitro*, dans les MSC80, que le chlorure de lithium induisait l'expression de ces gènes via inhibition de la dégradation de la β -caténine. Ainsi avons observé une hausse de l'expression de la β -caténine et de sa translocation dans le noyau, sans pour autant modifier la voie de signalisation AKT. Par la suite la β -caténine se fixe sur les éléments de réponse aux TCF/LEF localisés sur les promoteurs des gènes *MPZ* (site entre -8447 et -8471 pb) et *PMP22* (site entre +107 et +124 pb). A court terme, ce mécanisme accroît la quantité de protéine P0 et PMP22 et facilite la remyélinisation.

10. ARTICLE 6

Physical exercise reduces cardiac defects in type 2 spinal-muscular-atrophy-like mice

Olivier Biondi*, Philippe Lopes*, Celine Deseilles, Julien Branchu, Farah Chali, Amina Ben Salah, Claude Pariset, Christophe Chanoine et Frédéric Charbonnier.

¹ O.B and P.L. ont contribué de manière égale à ce travail.

^a Unité Mixte de Recherche 8194, Centre National de la Recherche Scientifique, Centre d'Etude de la Sensori Motricité, University Paris Descartes, 75270 Paris Cedex 06, France.

10.1. Introduction à l'article 6

Effet de l'exercice physique sur le système cardiovasculaire dans un contexte de SMA.

Depuis peu, il est admis que les patients atteints de SMA souffrent de problèmes cardiaques. Bon nombre d'études indiquent que l'altération des fonctions cardiaques serait liée à un dysfonctionnement de leur système nerveux autonome comme le suggèrent les symptômes cliniques : arythmie, fluctuation de la pression sanguine, problème de perfusion vasculaire et sudation excessive (Arai et coll., *J Child Neurol*, 2005; Hachiya et coll., *Brain Dev*, 2005; Bach, *Am J Phys Med Rehabil*, 2007; Araujo Ade et coll., *J Pediatr*, 2009). De même, il a été démontré récemment que les souris mimant la SMA présentaient une bradycardie, une réduction de l'innervation sympathique et une dilatation cardiaque associée à une diminution de la contractilité (Bevan et coll., *Hum Mol Genet*, 2010; Heier et coll., *Hum Mol Genet*, 2010).

Cependant, la nature de l'altération du système nerveux autonome reste inconnue dans la SMA, en particulier la contribution du réseau sympathique ou parasympathique dans la pathologie. De même, les effets de l'exercice physique ne sont pas connus dans ce contexte.

Nous avons évalué l'impact sur les fonctions cardiorespiratoires d'une course quotidienne dans une roue, un exercice physique modéré connu pour être bénéfique pour les souris mimant la SMA de type II (Grondard et coll., *J Neurosci*, 2005; Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008). Nous avons soumis des souris contrôles et mimant la SMA de type II à cet exercice physique quotidien. Les souris sédentaires, quant à elles, ont été placées dans la roue hors tension. Nous avons enregistré de manière non invasive les ECGs de ces souris via un système téléométrique à 30°C. Afin d'affiner notre perception du dysfonctionnement du système nerveux autonome, une part des souris a reçu une injection intrapéritonéale d'atenolol (inhibiteur pharmacologique du système sympathique) et une autre part, d'atropine (inhibiteur pharmacologique du système parasympathique) 45 min après le début de l'enregistrement des ECGs.

Nous avons complété ces expériences par l'analyse de coupes histologiques de cœur arrêtés durant la phase de contraction diastolique.

En outre, nous avons précédemment démontré que ces souris présentaient un retard de maturation de l'unité motrice dans son ensemble. Nous avons donc cherché à déterminer si ce phénomène s'étendait au muscle cardiaque. Par conséquent nous avons évalué les niveaux de troponine I cardiaque dans le cœur par western immunoblot et des transcrits α et β de la chaîne lourde la myosine par RT-PCR quantitative.

Pour ma part, j'ai pris en charge et entraîné les souris contrôles et mimant la SMA de type II. J'ai réalisé les prélèvements de muscle et de cœur de ces animaux. Enfin j'ai effectué l'analyse par western immunoblot de la troponine cardiaque et squelettique à différents temps suite ou non à un exercice.

Physical exercise reduces cardiac defects in type 2 spinal muscular atrophy-like mice

Olivier Biondi¹, Philippe Lopes^{1,2}, Céline Desseille¹, Julien Branchu¹, Farah Chali¹, Amina Ben Salah¹, Claude Pariset¹, Christophe Chanoine¹ and Frédéric Charbonnier¹

¹ Université Paris Descartes, UFR Biomédicale, PRES Sorbonne Paris-Cité, Centre d'étude de la sensorimotricité, UMR 8194 CNRS, 45 rue des Saints Pères, 75270 Paris Cedex 06, France

² Université d'Evry, Boulevard François Mitterrand, Evry, France

Key points

- The present study provides evidence that the cardiomyopathy observed in spinal muscular atrophy (SMA) model mice is mainly due to intrinsic cardiac alteration but not to autonomic impairment.
- We demonstrated a non-pathological sympathetic activity on the heart of type 2 SMA-like mice, which likely counteracts the dramatic alteration of the cardiac function, such as arrhythmia and reduced heart rate.
- We demonstrated for the first time that physical exercise partially restores cardiac conduction efficiency, prevents fibrosis, attenuates defects in protein expression, bradycardia and arrhythmias leading to the partial recovery of heart and respiratory rates in exercised SMA-like mice.
- This study indicates a profound involvement of cellular, structural and vascular cardiac dysfunction in the pathogenesis of SMA, widely opening alternative pharmacological and non-pharmacological therapeutic strategies that would most certainly include physical exercise.

Abstract Spinal muscular atrophy (SMA), the leading genetic cause of death in infants worldwide, is due to the misexpression of the survival of motor neuron protein, causing death of motor neurons. Several clinical symptoms suggested that, in addition to motor neurons, the autonomic nervous systems could be implicated in the cardiac function alterations observed in patients with SMA. These alterations were also found in a severe SMA mouse model, including bradycardia and a reduction of sympathetic innervation, both associated with autonomic imbalance. In the present study, we investigate the extent of autonomic dysfunction and the effects of a running-based exercise on the altered cardiorespiratory function in type 2 SMA-like mice. We observed that the SMA induced: (1) a dramatic alteration of intrinsic cardiac conduction associated with bradycardia; (2) a severe cardiomyopathy associated with extensive ventricular fibrosis; and (3) a delay in cardiac muscle maturation associated with contractile protein expression defects. Furthermore, our data indicate that the sympathetic system is not only functioning, but also likely contributes to alleviate the bradycardia and the arrhythmia in SMA-like mice. Moreover, physical exercise provides many benefits, including the reduction of cardiac protein expression defect, the reduction of fibrosis, the increase in cardiac electrical conduction velocity, and the drastic reduction in bradycardia and arrhythmias resulting in the partial restoration of the cardiac function in these mice. Thus, modulating the cardiorespiratory function in SMA could

O. Biondi and P. Lopes are joint first authors.

represent a new target for improving supportive care and for developing new pharmacological and non-pharmacological interventions that would most certainly include physical exercise.

(Received 19 June 2012; accepted after revision 22 August 2012; first published online 28 August 2012)

Corresponding authors O. Biondi and P. Lopes: Université Paris Descartes – CESEM UMR 8194, 45 rue des Saints Peres, Paris 75006, France. Email: olivier.biondi@parisdescartes.fr and philippe.lopes@parisdescartes.fr

Abbreviations ANS, autonomic nervous system; AV, atrioventricular; BW, body weight; ECG, electrocardiogram; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HE, haematoxylin eosine; HF, high-frequency; HR, heart rate; HRV, heart rate variability; IVS, intraventricular septum; MyHC, myosin heavy chain; PCR, polymerase chain reaction; RMSSD, root mean square of successive RR interval differences; SA, sinoatrial; SMA, spinal muscular atrophy; SMN, survival of motor neuron; TBS, Tris-buffered saline.

Introduction

Childhood spinal muscular atrophy (SMA) is a neurodegenerative disease with progressive muscular weakness and atrophy due to a loss of spinal cord motor neurons. No effective therapy is presently available for SMA, which represents a leading cause of death in childhood. SMA can be classified into three types, i.e. type 1 (most severe), type 2 and type 3 (least severe), on the basis of age of onset and functional status (Oskoui & Kaufmann, 2008). Patients with SMA have progressive respiratory muscle weakness that prevents their survival beyond infancy in type 1 SMA without ventilatory support, and beyond adolescence in type 2 SMA, often due to respiratory failure (Kostova *et al.* 2007).

In addition to directly affecting respiratory muscles via motor neuron degeneration, SMA may affect the autonomic nervous system (ANS) that regulates both the respiratory and the cardiac functions (Bernardi *et al.* 2001). Indeed, several studies pointed out a potential SMA-induced imbalance of the sympathovagal activity in patients with SMA, including cardiac arrhythmia and excessive sweating (Bach, 2007), fluctuation of blood pressure and heart rate (HR; Hachiya *et al.* 2005), vasomotor and sudomotor autonomic dysfunctions (Arai *et al.* 2005), and abnormalities in vascular perfusion (Araujo Ade *et al.* 2009). The detection of cardiac arrhythmias and other cardiovascular dysfunction of the conduction system are provided through the classical electrocardiogram (ECG). Currently, very little information is available on the development of ECG patterns in SMA. Recent reports in SMA mouse models clearly indicate that low survival of motor neuron (SMN) protein levels, besides contributing to motor neuron loss, would lead to early and persistent cardiac dysfunction (Bevan *et al.* 2010; Heier *et al.* 2010). This cardiac dysfunction results in bradycardia, and in the development of dilated cardiomyopathy associated with a decrease in contractility (Bevan *et al.* 2010) and cardiac sympathetic innervation (Heier *et al.* 2010). It seems therefore that some degree of intrinsic cardiac dysfunction and sympathovagal imbalance occurs in the development of SMA. However, the nature of the

SMA-induced autonomic system dysfunction remains unclear. Specifically, the overall contribution of the sympathetic and parasympathetic branches of the ANS in the pathogenesis of SMA needs to be elucidated. Furthermore, previous studies that have addressed the respiratory function in SMA-like mice gave rise to confusing results with, depending on the mouse model, either no impairment in respiratory rate (El-Khodori *et al.* 2008) or smaller ventilation levels with frequent and longer apnoea (Michaud *et al.* 2010). Because the respiratory function is also controlled by the ANS, analysing the involvement of cardiac sympathetic and parasympathetic influences along with respiratory rates in SMA and controls needs to be evaluated.

The ANS can be modulated by several well-described regulators of the autonomic function, one of which is physical exercise (Smith *et al.* 1989). Physical exercise induces long-term changes in sympathovagal balance of healthy subjects (De Meersman, 1993), and improves motor function and strength in neuromuscular diseases (Sveen *et al.* 2008), for which some are affected with autonomic function impairment (Yotsukura *et al.* 1998). Furthermore, we have recently reported that regular physical exercise is beneficial for type 2 SMA-like mice, as demonstrated by a significant increase in life span and motor capacities of exercised mice (Grondard *et al.* 2005).

In the present study, we analysed the effects of exercise on the intrinsic cardiac conduction, cardiomyocyte contractile unit proteins, and autonomic function during the postnatal period in wild-type and type 2 SMA-like mice (Hsieh-Li *et al.* 2000) using a non-invasive conscious mouse ECG screening system. Our data support the hypothesis that the heart of SMA-like mice is modulated by a functional sympathetic system, whose influence limits bradycardia and arrhythmia. Furthermore, we demonstrated for the first time that physical exercise improves cardiac function in type 2 SMA-like mice, through intrinsic cardiac conduction and contractile protein content modifications, prevention of cardiac fibrosis, bradycardia and arrhythmia.

Methods

Mice and treatment

The knock-out transgenic SMA-like mice (*Smn*^{Δ7/Δ7}; *SMN2*^{+/-}) were obtained from the Institute of Molecular Biology (Academia Sinica, Taipei, Taiwan). These mice derive from the SMN2 transgenic line from Hsieh-Li *et al.* (2000), which carry two SMN2 transgene copies as originally determined by Southern blots. These mice were subsequently purified in an FVB/NRj genetic background (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) for more than 10 generations. Heterozygous *Smn* knock-out (*Smn*^{Δ7/+}) mice were bred with heterozygous transgenic knock-out (*Smn*^{Δ7/+}; *SMN2*^{+/-}) mice. Breeder mice that gave only type 2 SMA-like mice in their progeny were selected for this study as described previously (Grondard *et al.* 2005; Biondi *et al.* 2008). To standardize the type 2 phenotype, mutant mice with a weight ranging from 3 to 4 g at 8 days old were used for this study. The control mice were heterozygous knock-out for *Smn* with the human SMN2 transgenes (*Smn*^{Δ7/+}; *SMN2*^{+/-}). Control mice (*n* = 40) were compared with unexercised (*n* = 34) and exercised (*n* = 34) type 2 SMA-like mice.

ANS influences upon cardiorespiratory function were analysed by pharmacological inhibition of both sympathetic (atenolol) and parasympathetic (atropine) branches on conscious controls (*n* = 8), unexercised (*n* = 8) and exercised (*n* = 8) type 2 SMA-like mice. Atropine (A0257-5G, Sigma-Aldrich, Germany) and atenolol (A7655-1G, Sigma-Aldrich) were intraperitoneally injected in conscious animals, 45 min after the start of ECG recording, with 2 μg g⁻¹ and 1 μg g⁻¹ doses of 50 mg ml⁻¹ and 0.3 mg ml⁻¹ diluted in NaCl 0.9% solutions, respectively. At P12 and/or after experiments, animals were anaesthetized with an intraperitoneal dose of sodium pentobarbitone (40 mg kg⁻¹), and were killed by an overdose of anaesthetics.

The care and treatment of animals followed the national authority (Ministère de la Recherche et de la Technologie, France) and the animal welfare committee guidelines for the detention, use and the ethical treatment of laboratory animals at Paris Descartes University. Our animal experiments followed the principles of United Kingdom regulations, as described by Drummond (Drummond, 2009).

Exercise protocol

Exercise was performed in an elastomer-covered wheel with a controlled speed essentially as described previously (Grondard *et al.* 2005). The protocol was started at 8 days old. The type 2 SMA-like mice (*n* = 34) were progressively accustomed to wheel exercise for a period of 2 days (first day, four periods of 5 min running separated by rest peri-

ods of 30 min; second day, two periods of 10 min running separated by a rest period of 30 min). Then, the mice were continuously exercised, individually, for 20 min day⁻¹. The speed was fixed at 2 m min⁻¹ for the first 2 days, and then progressively increased by 1 m min⁻¹ every day, reaching 4 m min⁻¹ on the fourth and final exercise day at P12.

Radiotelemetry system and temperature control

The radiotelemetry system used in this study allowed for ECG recordings in freely moving control (*n* = 15), unexercised (*n* = 15) and exercised (*n* = 15) type 2 SMA-like mice. The system consisted of flat transmitters (TA10ETA-F20; Data Sciences International, St Paul, MN, USA) with two electrodes filled with cardiac gel and placed on the skin of pups. The platform receivers were placed in a chamber (50 × 50 × 25 cm) kept at a constant temperature of 30 ± 0.2°C during the entire recording period using a precise temperature-controlled air heater (Air-Therm ATX, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Because HR and HR variability (HRV) are directly influenced by temperature in adult mice (Swoap *et al.* 2008), keeping a constant 30°C temperature allowed the maintenance of mice nesting temperatures. The temperature in the nest could be considered as a thermoneutrality state where very little fluctuations in HR and HRV occur. When measured at a constant 30°C, the pups had very little or no activity, allowing the constitution of a HR plateau where five successive periods of 2 min data were collected for further HRV analysis. Obtaining stationary data constitutes one of the requirements for frequency domain analysis of HRV (Task Force, 1996).

ECG data acquisition and processing

A Lead II configuration was used in order to provide large-amplitude deflection in the ECG signal. ECG signals were fed to a PC containing the Dataquest A.R.T. 4.1 data acquisition and analysis system (Data Sciences International) for monitoring and acquisition of ECG waves. ECG records showing more than 5% of abnormal beats were excluded from the study. For all experiments, the mice were placed in the 30°C heated chamber for a minimum period of 30 min. Five successive periods of stable 2 min stationary ECG signal with no erratic fluctuations were chosen between the 30th and 60th min, linear interpolated and resampled to a 20 Hz interbeat time series, together with Hamming windowing, providing better accuracy at regions close to the frequency limits of the available power spectrum (Stoica & Moses, 1997). For the pharmacological study, the analysis was performed just before the injection, and between the 20th and 30th min post-injection.

ECG cycle analysis

The ECG cycle analysis included the PR interval, QRS complex, QT interval and corrected QT (QTc) that were calculated from the average of three non-consecutive cardiac cycles over a 2 min recording period in unexercised and exercised control and SMA-like mice at P12. PR interval was measured from the beginning of the P-wave to the beginning of the QRS complex. The PR segment was calculated from the end of the P-wave to the beginning of the QRS complex. The QRS complex duration was measured from the first deflection of the Q-wave to the end of the S-wave. The QT interval was measured from the beginning of the QRS complex to the end of the T-wave. The RR interval was taken as the mean RR interval over the 3 min recording period, and the corrected QT interval (QTc) was calculated by using the following conversion formula: $QTc = QT/\sqrt{RR/1000}$ (Mitchell *et al.* 1998).

ECG variability analysis

The cardiovascular variability analysis was performed using customized HRV analysis software (Niskanen *et al.* 2004). HRV data were analysed in both time and frequency domains using standard HRV parameters. In the time domain, the following HRV parameters were quantified: (1) mean of HR (HR, beats min^{-1}); (2) root mean square of successive RR interval differences (RMSSD, ms) (Task Force, 1996). In the frequency domain, the cut-off frequencies for mice have recently been proposed (Baudrie *et al.* 2007; Thireau *et al.* 2008), and the following components have been recommended to gauge both the sympathetic and parasympathetic components of HRV: low-frequency (0.4–1.5 Hz, ms^2); and high-frequency (HF: 1.5–5.0 Hz, ms^2) (Task Force, 1996; Eckberg, 1997).

Protein and Western blot analysis

Control ($n = 9$), unexercised ($n = 3$) and exercised ($n = 3$) type 2 SMA-like mice were anaesthetized with an intra-peritoneal dose of sodium pentobarbitone (40 mg kg^{-1}) and, when the paw pressure reflex response was no longer observed, the beating hearts were dissected, put in a cold 0.9% NaCl solution ($+4^\circ\text{C}$) for 1 min and then frozen in cold isopentane (-80°C). Heart samples (25–50 mg) were homogenized in 100 μl /5 mg tissues of ice-cold RIPA buffer [50 mM Tris-HCl pH 8.0; 150 mM NaCl; 0.1% SDS; 0.5% sodium deoxycholate; 1% NP40; 5 mM EDTA pH 8.0; 2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF; Sigma-Aldrich); 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ leupeptin; 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pepstatin A; 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ aprotinin]. Protein concentration of the clarified homogenates (4°C , 15 min, 12,300 g) was determined on all samples using the Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Marne-La-Coquette, France). Protein samples (10 μg) of

each homogenate were submitted to 12.5% SDS-PAGE electrophoresis (1.5 M Tris pH 8.3, 12.5% acrylamide, 0.07% Bis, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.06% TEMED). The separated proteins were transferred on polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad) according to Towbin *et al.* (1984). Equal loading of samples was checked by Ponceau dye staining of the transferred gels. Western blot analysis was performed on membranes overnight at 4°C in 4% BSA, 0.05% Tween 20, Tris-buffered saline (TBS) pH 7.4. Each of the following primary antibodies, including monoclonal mouse anti-troponin I (1:500; HyTest Ltd, Finland) and monoclonal mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody (1: 5,000; Chemicon, Molsheim, France), was incubated overnight at 4°C in the above blocking medium. Membranes were rinsed in 0.1% Tween 20 in TBS for 3×10 min at room temperature, and then incubated in horseradish peroxidase-conjugated goat secondary antibody directed against mouse immunoglobulins (1: 5000; Bio-Rad Laboratories) in 0.05% Tween 20 in TBS for 1 h at room temperature. Bound antibody complexes were developed using the ECL system (Amersham Biotech., Saclay, France) and exposed to hyperfilm ECL-plus X ray film (Amersham Biotech.). Films were quantified with ImageJ v1.43 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and the results reported as means \pm SD.

Quantitative real time polymerase chain reaction (PCR) analysis

Total mRNA was extracted from frozen control ($n = 4$), unexercised ($n = 4$) and exercised ($n = 4$) type 2 SMA-like hearts using TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies, Sain-Aubin, France). One microgram was reverse-transcribed with random primers from Promega (Promega France, Charbonnières, France) and reverse transcriptase M-MLV-RT from Invitrogen. Quantitative real time PCR was performed with standard protocols using SYBRGreen ROX Mix (ABgene, Courtaboeuf, France) as a fluorescent detection dye in ABI PRISM 7000 in a final volume of 10 μl , which also contains 300 nM of the following primers (Operon, Cologne, Germany): GAPDH: F: 5'-GTG GAC CTC ATG GCC TAC AT-3'; R: 5'-TGT GAG GGA GAT GCT CAG TG-3'; α myosin heavy chain (MyHC): F: 5'-CC TGA GCA CAG AGC TCT TCA AA-3'; R: 5'-GT GCA CGT TTT TTC CCC CTT CT-3'; β MyHC: F: 5'-CTA CAG GCC TGG GCT TAC CT-3'; R: 5'-TCT CCT TCT CAG ACT TCC GC-3'.

The relative amounts of DNA in samples were determined on the basis of the threshold cycle for each PCR product (C_t). Samples were compared using the relative C_t method, where the amount of target normalized to the amount of endogenous control GAPDH and relative to the control sample is given by $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Histological analysis

Control ($n = 4$), unexercised ($n = 4$) and exercised ($n = 4$) type 2 SMA-like mice were anaesthetized with an intra-peritoneal dose of sodium pentobarbitone (40 mg kg^{-1}) and, when the paw pressure reflex response was no longer observed, the beating hearts were dissected and placed in a high calcium buffer to induce a cardiac arrest in the diastolic contraction phase. Hearts were then frozen in cold isopentane and maintained at -80°C in dry ice. Frozen sections ($8 \mu\text{m}$) were stained either by histological haematoxylin eosine (HE) staining, or by Sirius Red staining, dehydrated via an alcohol gradient (70, 90 and 100%) and mounted with Eukitt (VWR International, Strasbourg, France). The heart images were entirely analysed, and the pictures of each muscle were assembled using Adobe Photoshop v. CS5 for each mouse group.

Microscopy

All immunofluorescence images were collected with a CCD camera (QImaging Retiga 2000R Fast; Cooled Mono 12 bit) coupled with a RGB filter and mounted on an Olympus microscope (BX51, Rungis, France) using the Image Pro-Plus, v. 6.0, software (Media Cybernetics, Buckinghamshire, United Kingdom) with 200 ($20\times$ Olympus objective FL N 0.5) and 400 ($40\times$ Olympus objective UPlan FL N 0.75) magnifications.

Statistical analysis

Data were analysed with the SPSS 17.0 statistical package (SPSS, Chicago, IL, USA). All parameters are expressed as mean \pm SD. All data passed the Shapiro–Wilk normality test. For the analysis of cardio-respiratory parameters from P6 to P12, a two-way repeated-measures ANOVA, on both mice group and age factors, and the Holm–Sidak *post hoc* test were performed to verify significant differences between control and SMA-like mice. For all other comparisons, Student's *t* test was used to verify significant differences between control and SMA-like mice, and between unexercised and exercised SMA-like mice. Pearson's correlation analysis was performed between body weight (BW) and HR, and between BW and HF peak. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

HR and respiratory rates during the postnatal period in control and SMA-like mice

To investigate the cardiac function during the post-natal period, we measured HR in control and SMA-like mice in a $+30^\circ\text{C}$ thermoregulated chamber at the

asymptomatic age of P6, and from P9 to P12, where symptoms occur (Hsieh-Li *et al.* 2000). We found that, in controls, HR progressively increased with age from $525 \pm 22 \text{ beats min}^{-1}$ at P6, to $602 \pm 44 \text{ beats min}^{-1}$ at P12 (Fig. 1A and C). In contrast, in SMA-like mice, HR progressively decreased from $384 \pm 27 \text{ beats min}^{-1}$ to $302 \pm 64 \text{ beats min}^{-1}$ during the same period (Fig. 1B and C), with a huge fall of $60 \text{ beats min}^{-1}$ at P11, when compared with P10 ($P < 0.05$). Therefore, HR differences between controls and SMA-like mice increased with disease progression by about $141 \text{ beats min}^{-1}$ at P6 and $300 \text{ beats min}^{-1}$ at P12 (Fig. 1C).

We next investigated the respiratory function during the same period in control and SMA-like mice based on the frequency domain analysis of HRV. First, we analysed the HF component of the HRV, more specifically the frequency at which the HF peak occurs (Fig. 1D and E). In resting conditions, the HF peak provides a reliable estimation of the breathing rate (Hayano & Yasuma, 2003). We found that, in controls, the breathing rate significantly increased by about 50% from P6 to P12, corresponding to $177 \pm 54 \text{ breaths min}^{-1}$ and $262 \pm 42 \text{ breaths min}^{-1}$, respectively ($P < 0.001$; Fig. 1D and F). In contrast, in SMA-like mice, there was a significant 20% decrease in HF peak with age, with the associated breathing rate falling from $154 \pm 16 \text{ breaths min}^{-1}$ at P6 to about $120 \pm 24 \text{ breaths min}^{-1}$ at P12 ($P < 0.01$; Fig. 1E and F).

These results suggested that both cardiac and respiratory functions are drastically impaired in SMA-like mice. However, a correlation analysis performed with all mice groups from all ages showed that both HR (Fig. 2A) and HF peak (Fig. 2B) are highly linked to BW ($r^2 = 0.87$ and $r^2 = 0.70$, respectively, $P < 0.001$). Indeed, the BW of control mice increased with age from $4.4 \pm 0.7 \text{ g}$ at P6 to $6.8 \pm 0.6 \text{ g}$ at P12, while the BW of SMA-like mice increased from P6 to P10 and then drastically decreased, falling from $4.0 \pm 0.4 \text{ g}$ at P10 to $3.1 \pm 0.7 \text{ g}$ at P12 ($P < 0.05$; Fig. 2C). Therefore, after standardization to BW, no significant differences were observed between control and SMA-like mice for both cardiac and respiratory functions at any age, with constant values approaching $100 \text{ beats min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (Fig. 2D) and about 0.7 Hz g^{-1} (Fig. 2E). These results indicate that bradycardia and the drop in respiratory frequency are proportional to the decrease in BW of type 2 SMA-like mice.

Sympathetic system is functional in SMA-like mice and limits cardiac dysfunction

To determine the role of the autonomic function on the cardiac adaptation to mice growth in SMA, we performed time and frequency domain analyses of HRV in control and SMA-like mice from P6 to P12. While the HRV of control mice was stable with age, RMSSD doubled from

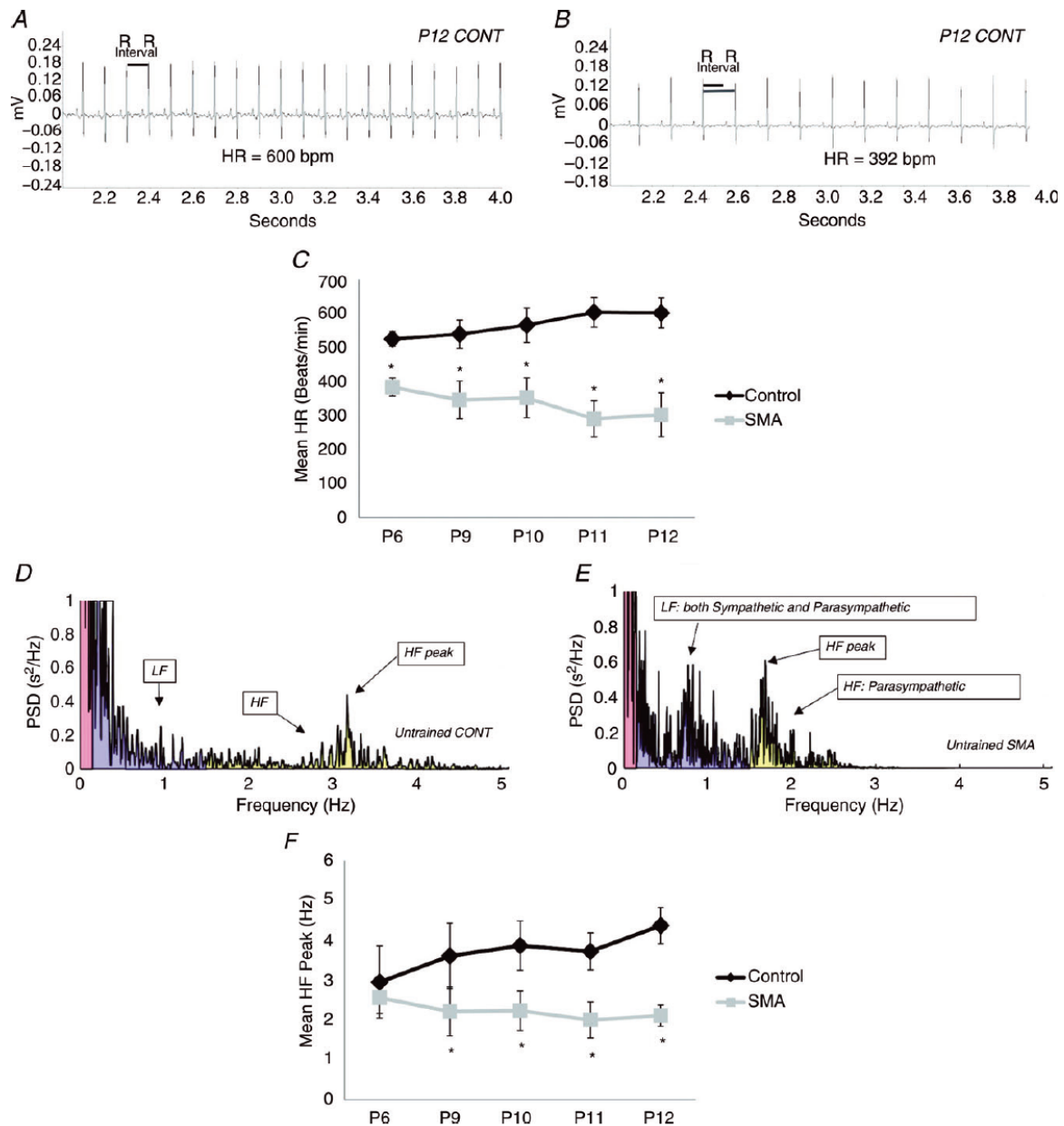


Figure 1. Heart rates (HRs) and respiratory rates are progressively altered in spinal muscular atrophy (SMA)-like mice at P12

A and B, representative ECGs (2 s) of control (A) and SMA-like mice (B) recorded during conscious and unrestrained conditions at 30°C. C, the RR intervals analysis shows progressive HR reduction during development in SMA-like mice compared with controls. D and E, power spectrum analysis of RR intervals derived from the five successive 2 min stationary RR data recorded in controls (D) and SMA-like mice (E). Based on the frequency at which the high-frequency (HF) peak occurs, the breathing rate of the mice is determined. F, breathing rate (HF peak) was reduced during development in SMA-like mice while it increased in controls. Error bars represent SD ($n = 15$ at P6, $n = 15$ at P9, $n = 15$ at P10, $n = 15$ at P11, $n = 15$ at P12; $*P < 0.05$). LF, low-frequency; PSD, Power Spectrum Density.

P10 to P12 in unexercised SMA-like mice (Fig. 3A). Our results therefore suggest a pathological increase in cardiac variability in SMA-like mice.

In order to investigate the autonomic influence on HR in SMA-like mice at P6 and P12, we performed a specific inhibition of either the sympathetic nervous system by intraperitoneal injection of a β_1 adrenergic receptor

inhibitor (atenolol) or the parasympathetic nervous system by intraperitoneal injection of a muscarinic receptor inhibitor (atropine). Interestingly, the atropine injection induced no significant HR (Fig. 3B and C) and RMSSD (Fig. 3D) modification in control and SMA-like mice ($P > 0.05$) suggesting that, at these ages, the parasympathetic branch of the ANS had no impact

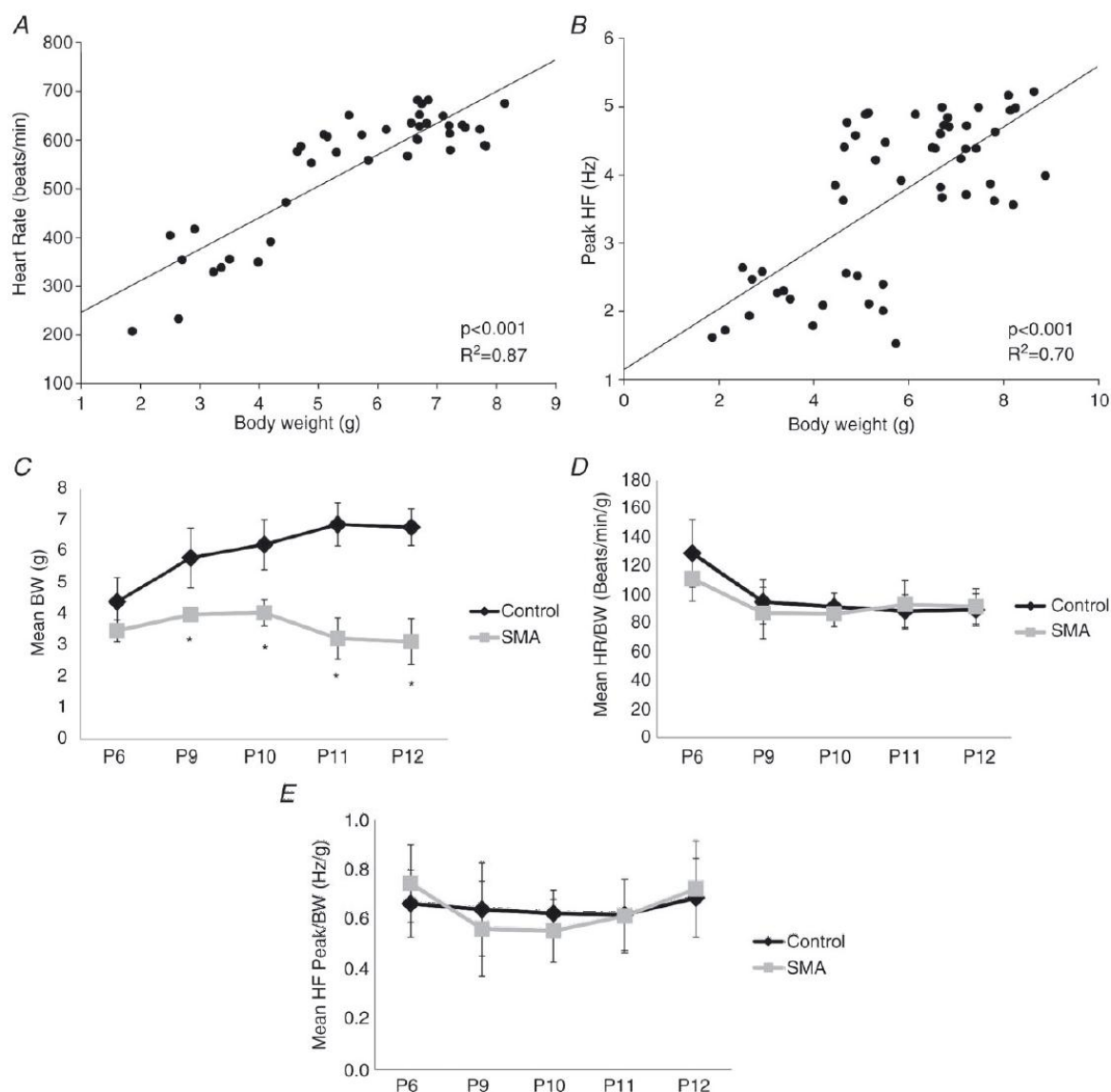


Figure 2. Adaptation of heart rates (HRs) and respiratory rates to growth of spinal muscular atrophy (SMA)-like mice

A and B, HRs (A) and respiratory (B) rates are correlated with body weight (BW) in control and SMA-like mice during development. C, BW progressively decreased with age in SMA-like mice compared with controls. D and E, standardized HR (D) and high-frequency (HF) peak (E) to BW show no significant difference during development between SMA-like mice and controls at any age. Error bars represent SD ($n = 15$ at P6, $n = 15$ at P9, $n = 15$ at P10, $n = 15$ at P11, $n = 15$ at P12; * $P < 0.05$).

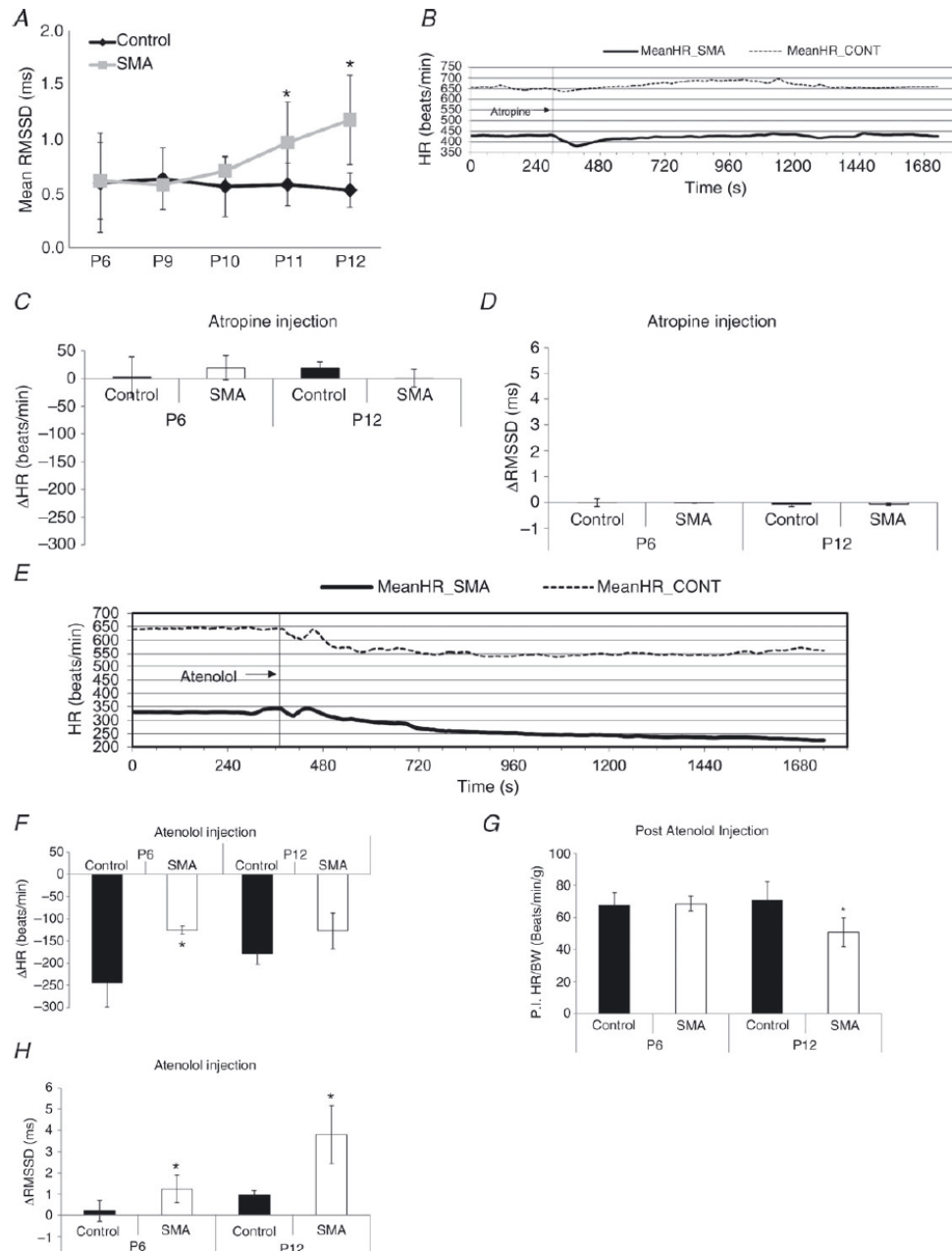


Figure 3. Cardiac arrhythmia in spinal muscular atrophy (SMA)-like mice increases with age and is counteracted by a functional sympathetic nervous system

A, SMA-like mice show an increase in cardiac variability (root mean square of successive RR interval differences, RMSSD) from P10 to P12 compared with controls. B, a representative time–frequency analysis indicated no change in heart rate (HR) of SMA-like mice and controls at P12 following muscarinic receptor inhibition with atropine. C and D, no significant changes in HR (C) and RMSSD (D) were observed following atropine injection between SMA-like mice and controls at P6 and P12. E, a representative time–frequency analysis indicated a drastic reduction in HR both in control and SMA-like mice at P12 following adrenergic receptor inhibition with atenolol. F, atenolol injection induced HR reduction in both control and SMA-like mice at P6 and P12. G, when standardized to body weight (BW), post-atenolol injection HR (P.I. HR) was significantly different between SMA-like mice and controls at P12. H, Sympathetic inhibition increased cardiac variability (RMSSD) in SMA-like mice at any age. Error bars represent SD ($n = 8$ at P6 and $n = 8$ at P12; $*P < 0.05$).

on HR and HRV, as previously shown (Sato, 2008). This result suggests that the increase of cardiac variability observed in SMA-like mice is not under the influence of the parasympathetic system.

After atenolol injection, a decrease in HR was observed for both control and SMA-like mice, which indicates that sympathetic influence on the heart is effective at these ages (Fig. 3E and F). Interestingly, the sympathetic activity decreased in control mice with age, with a loss of 244 ± 58 beats min^{-1} observed after injection at P6 and only 178 ± 24 beats min^{-1} at P12 ($P < 0.05$; Fig. 3F). In contrast, in SMA-like mice, the sympathetic influence was maintained at an elevated level for both ages, with a mean drop of about 127 ± 24 beats min^{-1} ($P < 0.05$; Fig. 3F). So, despite a decrease in absolute HR in SMA-like mice with age when compared with control mice, the decrease in cardiac frequency after atenolol injection was of the same magnitude compared with control mice. Moreover, when HR was standardized to BW, a 36% decrease in HR was found in SMA-like mice compared with controls (50 and 73 beats $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$, respectively; $P < 0.05$; Fig. 3G), whereas no difference was reported without sympathetic inhibition (Fig. 2D). These data seem to indicate no defect in sympathetic activity for SMA-like mice.

The cardiac variability analysis at P6 and P12 after atenolol injection revealed a significant increase in RMSSD in SMA-like mice at both ages ($P < 0.05$; Fig. 3H), whereas no significant modulation was detected in control mice at any age (Fig. 3H). Furthermore, cardiac variability after sympathetic inhibition in SMA-like mice increased by 300% at P12 when compared with P6, suggesting a direct link between the increase in variability and the disease progression. Taken together, these results suggest that sympathetic activity counteracts bradycardia and cardiac arrhythmia in SMA-like mice.

Cardiac conduction duration is increased in SMA-like mice

To delineate the type of myocardium disturbances in SMA-like mice, we investigated the intrinsic cardiac function through the recording of PR intervals, QRS complex and corrected QT (QTc) in three non-consecutive cardiac cycles in control and SMA-like mice at P12 (Fig. 4A and B). Cardiac conduction characteristics showed an increase in conduction time between the sinoatrial (SA) and atrioventricular (AV) nodes of SMA-like mice, as indicated by the elongated PR interval (64.5 ± 5.5 ms in SMA and 31.2 ± 0.9 ms in controls; $P < 0.05$; Fig. 4C). The ventricular depolarization times were also elongated, with a significant increase in QRS complex duration in SMA-like mice compared with controls (15.4 ± 5.3 ms and 10.6 ± 0.3 ms, respectively; $P < 0.05$; Fig. 4D). However, no significant differences were found in the corrected

QT interval between SMA-like mice and controls (83.9 ± 6.1 ms and 76.9 ± 3.0 ms, respectively; Fig. 4E). Taken together, these data further support the hypothesis of a severe bradycardia associated with cardiac conduction defects in SMA-like mice, as reported in other SMA mouse models (Heier *et al.* 2010).

Contractile function is altered in the myocardium of SMA-like mice

Our laboratory (Biondi *et al.* 2008) and others (Kariya *et al.* 2008; Kong *et al.* 2009; Martínez-Hernández *et al.* 2009) have previously indicated a motor unit maturation delay observed at the skeletal motor unit level in type 2 SMA-like mice. We therefore questioned the potential cardiac developmental defects with a particular impact on the postnatal maturation of cardiomyocytes. We analysed the expression of two contractile unit proteins of the cardiomyocyte, also markers of cardiac postnatal development, namely, troponin I and MyHC. Troponin I is expressed in skeletal isoform during the embryonic stages and is progressively replaced by the cardiac troponin isoform during the postnatal period (Adamcova & Pelouch, 1999). For the MyHC, only the β -isoform is expressed during the early embryonic stage and then progressively replaced by the α -isoform during the postnatal maturation (Lompre *et al.* 1984). The switch between β - and α -MyHC reflects the adaptation of the cardiac contractile capacity to growth (Lompre *et al.* 1984). The expression patterns of troponin I were analysed by Western blot on cardiac extracts in control and SMA-like mice at P6, P8 and P12. Our results indicated a decrease in the expression of skeletal isoform of troponin I from P6 and P12 with, in particular, a 50% reduction in the heart of control mice between P8 and P12 ($P < 0.05$; Fig. 5A and B). The isoform shift was nearly completed at P18 (Supplementary Fig. 1). In contrast, we found a residual expression of the skeletal troponin I isoform in the heart of SMA-like mice, with a fivefold increase when compared with matched controls at P12 ($P < 0.05$; Fig. 5C and D).

We next analysed by quantitative PCR the expression profile of β - and α -MyHC in the myocardium of controls and SMA-like mice at P6, P8 and P12. In controls, a significant 30% increase in the expression of α -MyHC transcripts was found between P6 and P8 ($P < 0.05$; Fig. 5E), that paralleled a decrease in β -MyHC transcripts expression (Fig. 5F). β -MyHC expression, already found in minority at P6, decreased by more than fivefold until P12 ($P < 0.05$; Fig. 5F). In SMA-like mice, α -MyHC was found downexpressed twofold when compared with controls ($P < 0.05$; Fig. 5G). We found, in parallel, a 1.5-fold decrease in β -MyHC expression that could suggest a loss of contractile components in cardiomyocytes of

SMA-like mice at P12 ($P < 0.05$; Fig. 5H). This result seems to indicate a contractile protein expression defect.

These data prompted us to initiate a histological analysis of heart ventricles in SMA-like mice and controls at P12. After a transversal section in the middle of ventricles of stopped hearts in the diastole phase, HE staining confirmed specific structural defect in SMA-like mice when compared with matched control mice (Fig. 5I and J). Muscle ventricles from SMA-like mice appeared atrophic with a 50% decrease in total area compared with control hearts ($P < 0.05$; Fig. 5K). This decrease was coherent with a 50% loss in heart weight (Supplementary Fig. 2), BW (Fig. 2C) and a 40% decrease in the body size (data not shown) at P12 in these mice. When heart weight was standardized to BW (Supplementary Fig. 2), no significant difference was observed. Cardiomyocytes of SMA-like mice appeared disorganized, isolated, round and atrophic (Fig. 5J). Furthermore, the intraventricular septum (IVS) and both ventricular walls appeared thinner in SMA-like mice compared with control mice ($P < 0.05$; Fig. 5L–N), even when values were normalized with owner

heart diameter. Finally, after Sirius Red staining, a high proportion of fibrosis was observed in the same ventricle sections of SMA-like mice (Fig. 5P), while no fibrosis was detected in control mice (Fig. 5O).

Physical exercise partially corrects cardiac muscle breakdown in SMA-like mice

We next evaluated the effects of exercise on the expression profile of troponin I and α - and β -MyHC in the myocardium of control and SMA-like mice at P12. Physical exercise induced a threefold decrease in the expression of the skeletal isoform of the troponin I in SMA-like mice compared with unexercised mice ($P < 0.05$; Fig. 6A and B), suggesting an exercise-induced promotion of the transition from skeletal to cardiac isoforms. Furthermore, exercise promoted the expression of both MyHC isoforms with, in particular: (1) a 50% increase in the expression of α -MyHC in exercise-treated SMA nearly reaching control levels; and (2) a fourfold increase in the expression of

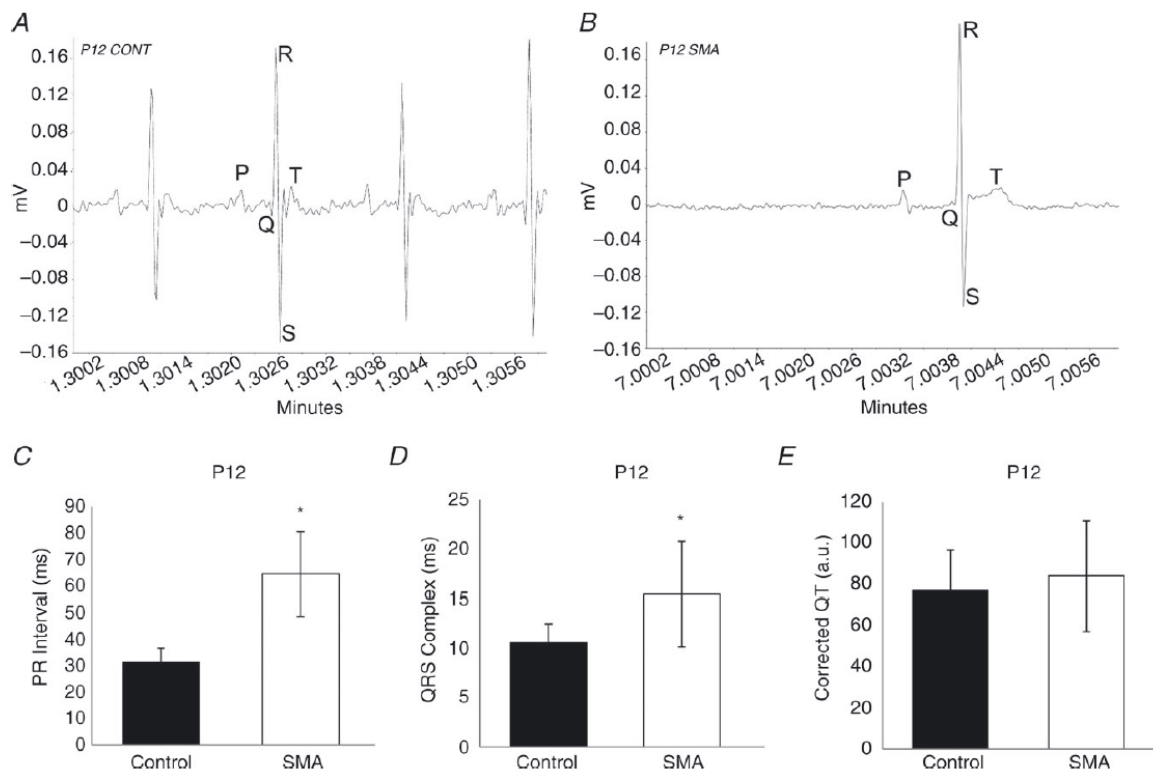


Figure 4. Cardiac conduction is decreased in spinal muscular atrophy (SMA)-like mice at P12
A and B, representative ECGs (6 ms) of control (A) and SMA-like mice (B) recorded during conscious and unrestrained conditions at 30°C. C–E, cardiac conduction analysis shows an increase in PR interval (C) and QRS complex duration (D) in SMA-like mice compared with control mice, while the corrected QT interval was not significantly different (E). Error bars represent SD ($n = 15$; a.u., arbitrary unit; * $P < 0.05$).

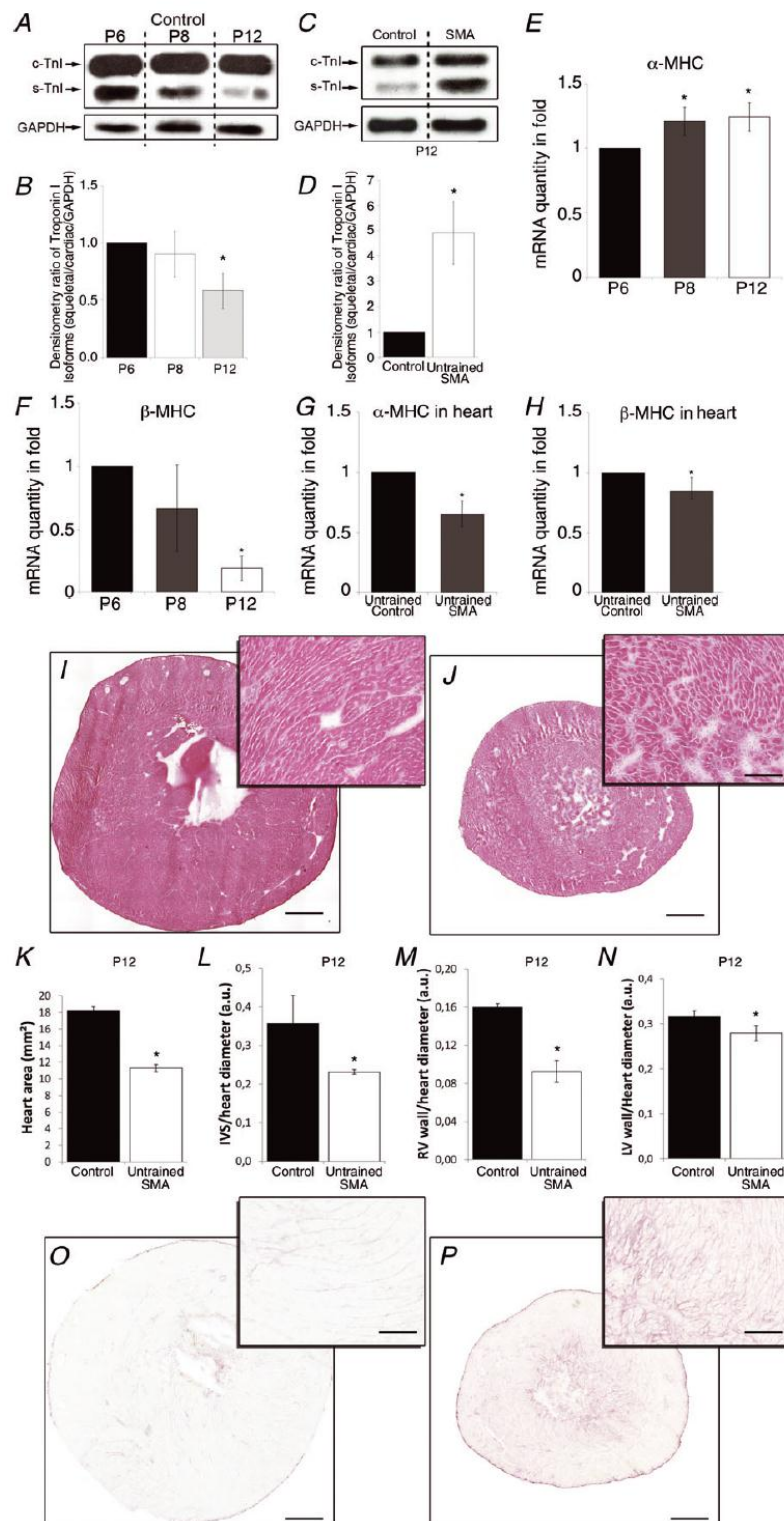


Figure 5. Contractile protein expression and cardiac structure is affected in spinal muscular atrophy (SMA)-like mice

A–D, Western blot analysis of the troponin I expression in the heart of control mice revealed a switch from skeletal to cardiac isoform with age (A and B, $n = 3$ at P6, P8 and P12), while the skeletal isoform remained overexpressed in SMA-like mice at P12 (C and D, $n = 3$). E–H, quantitative PCR analysis of the myosin heavy chain (MyHC) mRNA expression in the heart of control mice shows an increase in alpha isoform expression (E) and a decrease in beta isoform expression (F) with age, while the expression of both isoforms was downregulated in SMA-like mice at P12 (G and H, $n = 4$). I and J, HE staining of ventricles cross-sections in control (I) and SMA-like mice (J) at P12, with a zoom in each section. K, morphometric analyses of the ventricles show a dramatic decrease in heart area in SMA-like mice at P12. L–N, when standardized to heart diameter, the thickness of the intraventricular septum (IVS; L) and the wall of the right (RV; M) and left (LV; N) ventricles were decreased in SMA-like mice compared with control mice at P12 ($n = 4$). O and P, Sirius Red staining of ventricles cross-sections in control (O) and SMA-like mice (P) at P12, with a zoom in each section, show fibrosis in the heart of SMA-like mice only ($n = 4$). Error bars represent SD (a.u., arbitrary unit; $*P < 0.05$). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

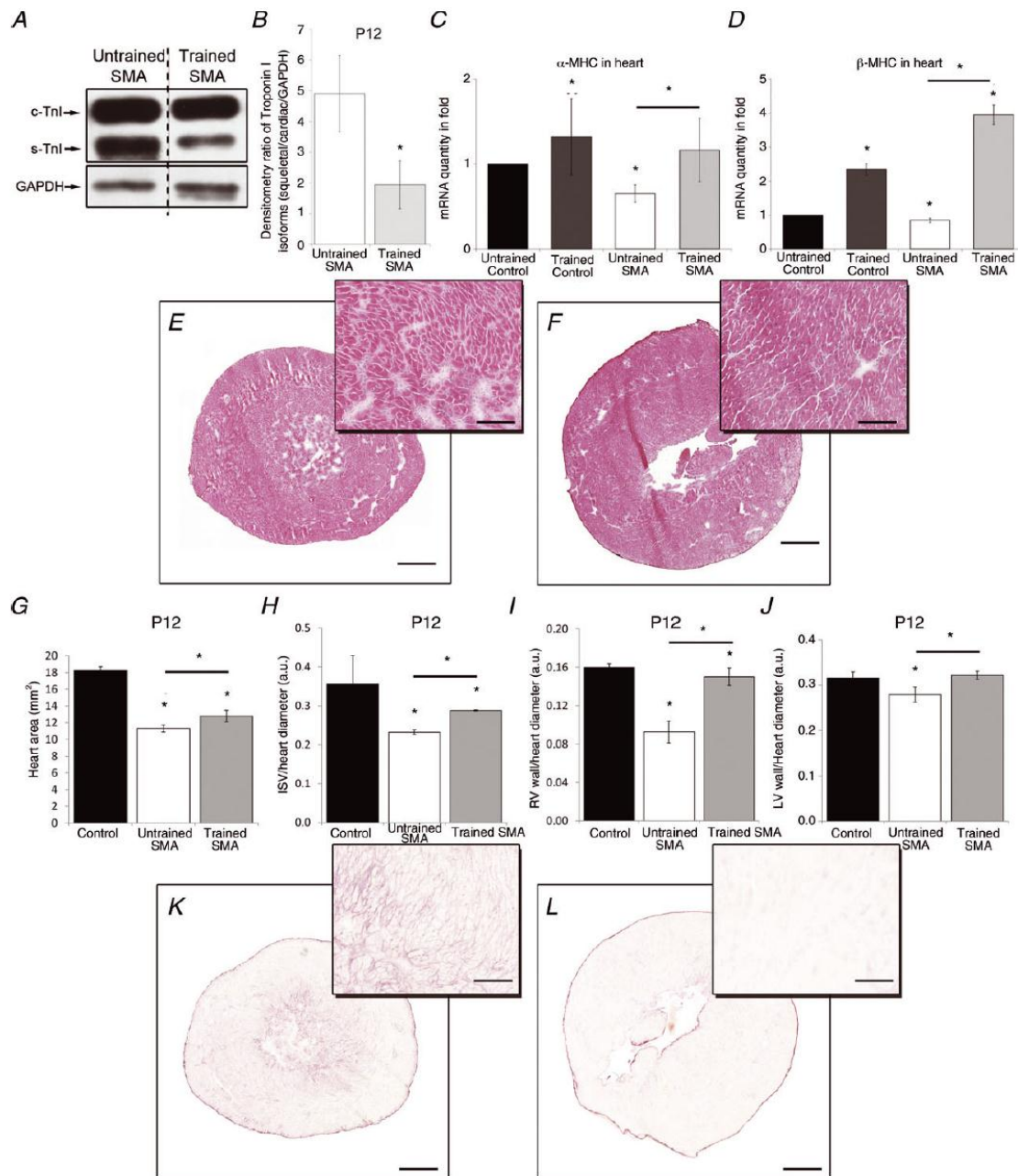


Figure 6. Physical exercise partially corrects cardiac structure and contractile protein expression in spinal muscular atrophy (SMA)-like mice at P12

A and **B**, physical exercise in SMA-like mice promoted the expression switch from skeletal to cardiac isoforms of troponin I ($n = 3$). **C** and **D**, physical exercise promoted the expression of α - and β -myosin heavy chain (MyHC) isoforms both in control and SMA-like mice ($n = 4$). **E** and **F**, HE staining of ventricles cross-sections in unexercised SMA-like mice (**E**) and exercised SMA-like mice (**F**), with a zoom in each section. **G–J**, physical exercise in SMA-like mice significantly increased the heart area (**G**) and, when standardized to heart diameter, increased also the thickness of the intraventricular septum (IVS; **H**) and the wall of the right (RV; **I**) and left (LV; **J**) ventricles ($n = 4$). **K** and **L**, compared with unexercised SMA-like mice (**K**), the heart fibrosis was reduced in exercised SMA-like mice (**L**; $n = 4$). Error bars represent SD (a.u., arbitrary unit; * $P < 0.05$). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

β -MyHC in exercised compared with unexercised SMA ($P < 0.05$; Fig. 6C and D).

As expected, the beneficial effects of the exercise programme were observed following histological analysis of the ventricular muscle from SMA-like mice (Fig. 6E and F). After exercise, all cardiac structural parameters appeared less affected than in sedentary counterparts. An increase of 15% in heart area (Fig. 6G) was observed, paralleling a 15% increase of the body size in exercised type 2 SMA-like compared with unexercised mice (data not shown). About 25% increase of normalized IVS thickness was observed in exercised heart of SMA-like mice, and the thickness of the ventricular walls was restored to near control values ($P < 0.05$; Fig. 6H–J). Finally, fibrosis was decreased in the heart of exercised SMA-like mice (Fig. 6L) when compared with unexercised SMA-like mice (Fig. 6K), as revealed by Sirius Red staining.

Physical exercise improves cardiac function in SMA-like mice

At P12, time and frequency domain analyses of the HRV were next used to investigate the autonomic modulation

induced by physical exercise in SMA-like mice. We found that the RMSSD significantly decreased in exercised SMA-like mice compared with unexercised counterparts ($P < 0.05$; Fig. 7A). Importantly, after the exercise period, no significant difference was found between exercised SMA-like mice and unexercised control mice for RMSSD, suggesting a restoration of the cardiac variability with exercise in SMA-like mice. Furthermore, no significant impact of physical exercise was found on autonomic function in control mice (Fig. 7A).

To investigate the potential benefits of physical exercise on HR and cardiac arrhythmia, we performed specific inhibitions of both autonomic branches in exercised and unexercised control and SMA-like mice at P12. After atenolol injection, the level of the HR decrease was not significantly different in exercised control and SMA-like mice when compared with sedentary counterparts (Fig. 7B). However, and importantly, when standardized with BW, this basic level of HR, i.e. deprived of sympathetic influence, was similar in range with the sedentary control (69 ± 14 beats $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$; Fig. 7C). This effect was associated with a drastic reduction in RMSSD after injection in exercised compared with unexercised SMA-like mice ($P < 0.05$; Fig. 7D), suggesting that exercise

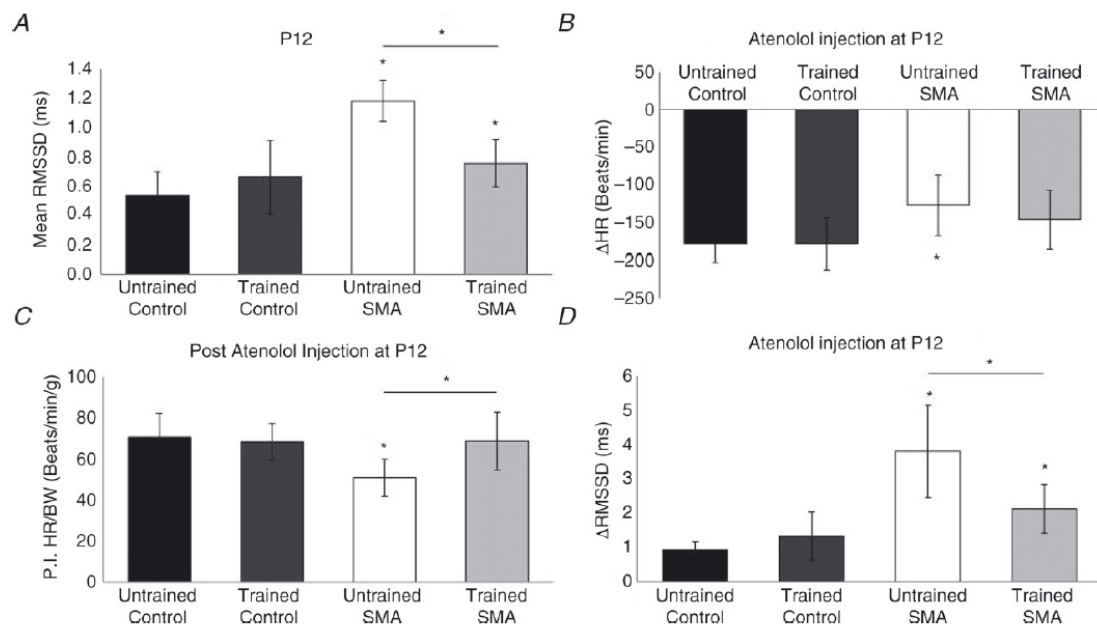


Figure 7. Physical exercise reduces cardiac arrhythmia defects without changing autonomic balance in spinal muscular atrophy (SMA)-like mice at P12

A, cardiac variability (root mean square of successive RR interval differences, RMSSD) decreased in exercised SMA-like mice compared with unexercised SMA-like mice, while no difference was observed in control mice ($n = 15$). B, following adrenergic receptor inhibition with atenolol, a comparable level of heart rate (HR) reduction was recorded in exercised control and SMA-like mice compared with unexercised mice. C, when standardized to body weight (BW), only the post-atenolol injection HR (P.I. HR) of exercised SMA-like mice reached a level comparable to controls. D, the exercise programme limited the RMSSD increase induced by the sympathetic inhibition in SMA-like mice. Error bars represent SD ($n = 8$; * $P < 0.05$).

was able to reduce significantly the constitutive arrhythmia in SMA-like mice. In order to investigate the potential impact of exercise on the parasympathetic branch of the ANS, we analysed cardiac variability in exercised and unexercised SMA-like mice after inhibition of muscarinic receptors by atropine. As expected, after atropine injection, no variation in HR, standardized or not to BW, or in RMSSD was recorded in both exercised and unexercised mice (Supplementary Fig. 3).

Physical exercise partially restores electrical conduction in SMA-like mice

We next questioned whether an exercise protocol could provide benefits on the cardiac conduction system in SMA-like mice at P12 (Fig. 8A and B). Physical exercise proved to be sufficient to significantly reduce the PR interval (64.5 ± 5.5 ms and 46.2 ± 2.3 ms in unexercised and exercised SMA-like mice, respectively, $P < 0.05$; Fig. 8C) and QRS complex duration (15.4 ± 5.3 ms and 12.5 ± 3.1 ms in unexercised and exercised SMA-like mice, respectively, $P < 0.05$; Fig. 8D), suggesting a partial restoration of the conduction time between the SA and AV nodes in exercised SMA-like mice. No significant differences were found in corrected QT interval between unexercised and exercised SMA-like mice (83.9 ± 6.1 ms and 74.4 ± 7.5 ms, respectively; Fig. 8E).

Beneficial effects of exercise on SMA-induced bradycardia and respiratory dysfunction are weight dependent

We finally determined whether an exercise protocol could provide benefits on cardiorespiratory function in SMA-like mice at P12. Four days of a moderate running-based exercise proved to be sufficient to increase significantly the absolute HR of SMA-like mice by about 37%, albeit without reaching a level comparable to controls ($P < 0.05$; Fig. 8F). Physical exercise provided also a significant effect on the respiratory function in SMA-like mice, with a 30% increase in HF peak from 2.11 ± 0.41 Hz in unexercised to 2.75 ± 0.57 Hz in exercised SMA-like mice ($P < 0.05$; Fig. 8G). However, the BW of exercised SMA-like mice also increased by 37% when compared with unexercised SMA-like mice ($P < 0.05$; Fig. 8H). Consequently, absolute HR and HF peak standardized to BW showed no significant differences after exercise, suggesting that those parameters are linked (Fig. 8I and J).

Discussion

We provide here the first evidence that physical exercise partially restored cardiac structure and function in type 2 SMA-like mice, including cardiac conduction efficiency,

potentially through the prevention of fibrosis. These exercise-induced effects led to the drastic reduction of bradycardia and arrhythmia, and to the partial recovery of HR and respiratory rate in exercised SMA-like mice.

The CNS acts as a control system for many physiological functions, including HR and HRV, breathing rate, vascular perfusion, digestion, salivation and perspiration. Although, in SMA, the CNS and motor neurons, in particular, are clearly affected by SMN deficiency and constitute the primary target for therapeutic strategies, other systems, including cardiac function, could also suffer from SMN deficiency and play a part in the pathogenesis of SMA. A series of case reports has been provided in the literature, indicating growing evidence for cardiac abnormalities in patients with SMA (Arai *et al.* 2005; Hachiya *et al.* 2005; Araujo Ade *et al.* 2009) and in SMA animal models (Bevan *et al.* 2010; Heier *et al.* 2010; Shababi *et al.* 2010). So far, very little is known about the primary causes of cardiac dysfunction in SMA, and some reports begin to suggest the implication of the ANS in the development of SMA (Bevan *et al.* 2010; Heier *et al.* 2010).

When we analysed the autonomic system function in type 2 SMA-like mice during the postnatal period, we found a progressive increase in HRV, becoming dramatically high at P12, a time point at which most of the type 2 SMA-like mice die. This progressive increase in HRV parallels a decrease in HR during the same development stages of type 2 SMA-like mice. This physiological phenomenon is classically associated with an increase in cardiac parasympathetic influence (Task Force, 1996), and pointed out as a plausible hypothesis by several reports to explain the bradycardia and arrhythmia in SMA-like mice (Bevan *et al.* 2010; Heier *et al.* 2010). However, our pharmacological analysis revealed that parasympathetic blockade failed to affect HRV and intrinsic HR in resting SMA and control mice at P12. Similar observations were reported in other wild-type mice at P6 and P12 (Sato, 2008), suggesting that the parasympathetic system is not influential at this age.

More interestingly, we found that sympathetic inhibition drastically reduced HR in both controls and type 2 SMA-like mice at P12, further emphasizing the influence of adrenergic stimulation in mice HR at this age. Surprisingly, this sympathetic inhibition also induced an increase in HRV only in type 2 SMA-like mice. Therefore, it could be hypothesized that the sympathetic activity found in type 2 SMA-like mice would likely prevent further cardiac rhythm deterioration and exacerbation of cardiac arrhythmias. So, our results support the hypothesis that the cardiac dysfunction found in SMA mice would come from a specific myocardial defect rather than a pathological sympathetic influence. Interestingly, the study from Arai and colleagues (Arai *et al.* 2005) suggested an hyperactivity of the sympathetic nervous system in

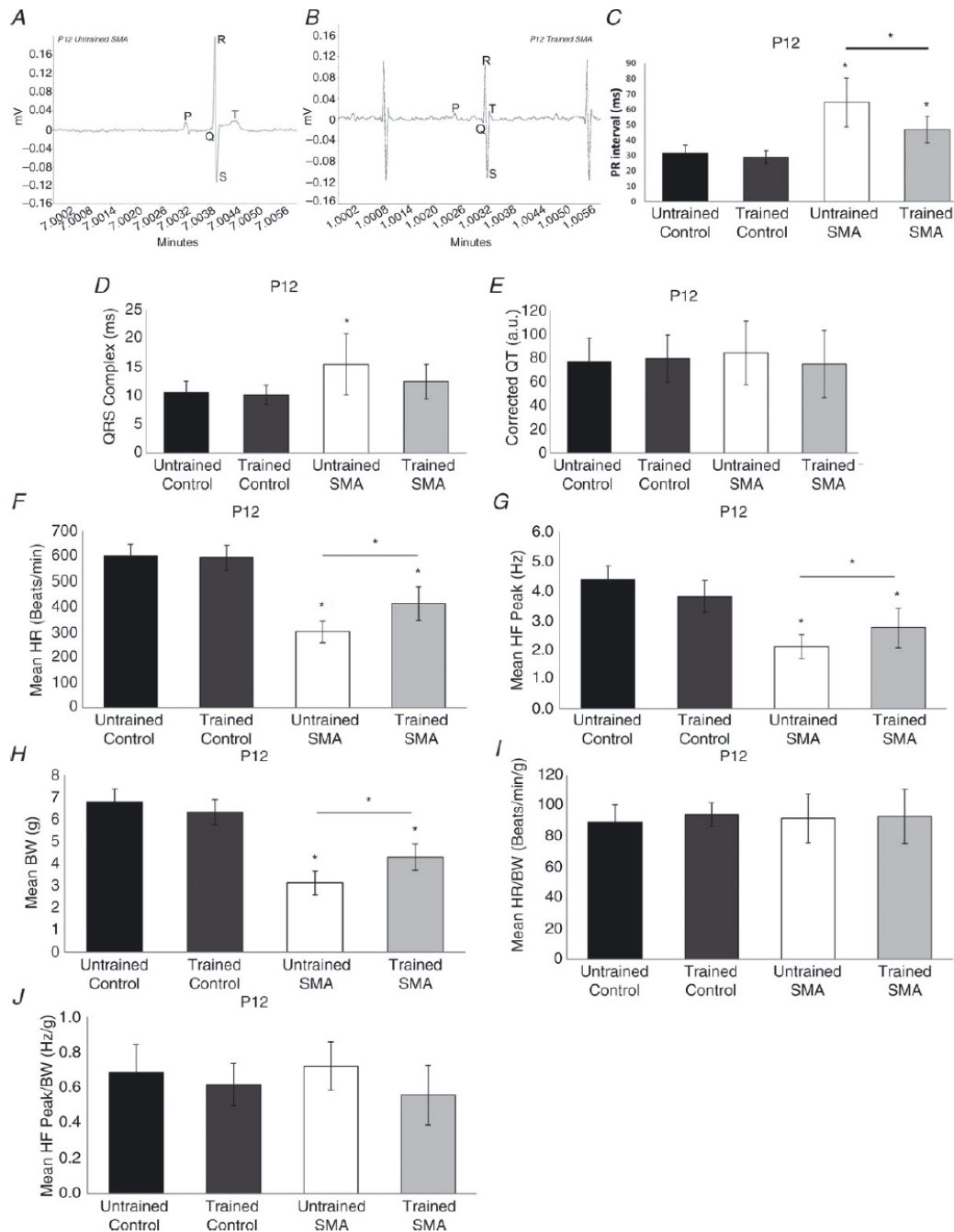


Figure 8. Physical exercise increases cardiac conduction, heart rates (HRs) and breathing rates in spinal muscular atrophy (SMA)-like mice at P12

A and B, representative ECGs (6 ms) of unexercised (A) and exercised SMA-like mice (B) recorded during conscious and unrestrained conditions at 30°C. C and D, physical exercise in SMA-like mice induced a significant reduction in PR interval (C) and QRS complex durations that reached a level comparable to controls (D). E, no modification in corrected QT interval was observed in all groups of mice (E; $n = 15$). F–H, Physical exercise increased HR (F), high-frequency (HF) peak (G) and body weight (BW) of SMA-like mice (H). I and J, no difference in HR (I) and HF peak (J) was detected between all groups when standardized by BW ($n = 15$; $*P < 0.05$).

some patients with severe SMA, providing a potential explanation for some SMA-related symptoms, such as finger-cold vasodilatation and sympathetic skin response abnormalities, but not for others, in particular the defects in vascular perfusion (Araujo Ade *et al.* 2009). In the light of our work, this sympathetic overactivation observed in patients with SMA could be a consequence of a cardiomyopathy and not its cause.

Physical exercise is considered as an appropriate alternative therapy for the maintenance of cardiac stability in various cardiac pathological conditions (Billman, 2002). The influence of exercise on cardiovascular function has been investigated in adult mice, where dynamic exercise induced a resting bradycardia and an improvement in baroreflex-mediated tachycardia (De Angelis *et al.* 2004), similar to the exercise response observed in humans (Dixon *et al.* 1992; Hall, 2008). However, no study has evaluated the effects of physical exercise on the ANS of newborn mice. In the present study, unexpectedly, we showed that exercise induced a reduction in cardiac variability and increased HRs in type 2 SMA-like mice with no change in controls. Concerning the autonomic function, while no parasympathetic activity was found after exercise, an increase in cardiac sympathetic influence was recorded in SMA mice. This result would indicate that in a pathological context, the exercise induces a remarkable improvement in cardiac function but does not modify the autonomic balance.

Furthermore, the cardiac dysfunction reported in SMA-like mice could be associated with cellular architecture changes of cardiac tissue (Gardner *et al.* 1985). To this respect, we analysed the cardiac muscle troponin I expression and revealed a defect in the transition from skeletal to cardiac isoforms with age, suggesting a delay in cardiac maturation in type 2 SMA-like mice and a plausible cause of cardiomyopathy. Indeed, defects or mutations of cardiac muscle proteins, including cardiac troponin I or T, have been associated with cardiomyopathy in mice as well as in humans (Tsoutsman *et al.* 2006, 2008). Furthermore, mutation in troponin I in mouse induces an hypertrophic cardiomyopathy associated with an absence of normal exercise response, amongst others a lack of left ventricle contractility improvement (Nguyen *et al.* 2007). We show here that exercise promoted cardiac-isoform expression of troponin and, subsequently, an improvement in cardiac function.

Another well-described heart defect comes from the modification of the α - and β -isoforms of the cardiac MyHC expression, whose respective proportion is being controlled by developmental and hormonal factors (Everett *et al.* 1984; Allen *et al.* 2001). Indeed, in failing adult mouse hearts, a shift from the normally predominant α -MyHC toward the β -MyHC is often observed (Harada *et al.* 1999). In the present study, we mainly observed a decrease in the expression of

α -isoform, suggesting a cardiac contraction defect due to ATPase activity modifications, as demonstrated by Krenz *et al.* (2003). More interestingly, exercise induced a large increase in the expression of both isoforms, with a more pronounced effect on β -MyHC, whose overexpression is often correlated with a non-pathological cardiac hypertrophy (Jones *et al.* 1996), suggesting a beneficial effect of exercise on cardiac function in SMA-like mice. The evaluation of protein isoforms expression with highly specific antibodies could provide some clues for the evaluation of mRNA translation and stability modifications in SMA context and after exercise. However, several publications demonstrated a direct link between isoforms mRNA expression and cardiac function (Alpert *et al.* 2002; Krenz *et al.* 2003).

In our ECG analysis, a dramatic decrease in cardiac function was also revealed by an increase in conduction times from the SA to the Purkinje fibres of the type 2 SMA-like mice. The causes of arrhythmia and slow conduction may involve decreases in cell excitability (Cranefield *et al.* 1972), dilatation of ventricles and in contractile protein expression, including α -MyHC (Berul *et al.* 1997).

The physical exercise exerts beneficial effects on cardiac conduction properties of the SMA-like mice by reducing the PR interval. However, the specific mechanisms involved are still unknown, but could implicate a combination of multiple factors, including contractile protein rearrangement, fibrosis prevention and calcium-activated signalling known to modulate cardiomyocytes excitability (Chai *et al.* 2011).

Among the many pathological systems involved in SMA, a crucial one concerns the control of the respiratory function, including ventilatory parameters that are associated with a reduction of vital capacities (Samaha *et al.* 1994; Bach *et al.* 2012). Surprisingly, a limited number of studies have investigated the respiratory rate in human or mouse models. Here, we provide the first lines of evidence for a dramatic reduction in respiratory rates in severe SMA-like mice. Interestingly, significant alterations in respiratory rates were not observed in another SMA mouse model of comparable severity, from P0 to P8 (El-Khodori *et al.* 2008), an apparent controversy that might be resolved considering the age of respiratory symptoms appearance (P6–P12). In a more severe SMA mouse model, smaller ventilation levels with frequent and longer apnoeas were found at 7 days old, while the breathing pattern was normal at P1 (Michaud *et al.* 2010). Thus, the progressive deterioration of breathing patterns from P6 to P12 we observed in the type 2 SMA-like mice should certainly proceed from the respiratory muscles denervation phenomenon occurring at these ages (Kariya *et al.* 2008; McGovern *et al.* 2008). Interestingly, no breathing rate changes occurred when related to body size, indicating an overall cardiorespiratory adaptation

during growth in mice. It is important to note that during the postnatal development period, HR to BW ratios did not change during growth, in control as well as in SMA mice, suggesting a cardiorespiratory adaptation during this normally rapid development period in neonates. These cardiorespiratory adaptations were also found on SMA-like mouse models with equivalent lifespan (Heier *et al.* 2010).

Most importantly, the present study provides the first lines of evidence for the partial restoration of ventilatory patterns with physical exercise in an SMA context. The increase in breathing rates we observed in SMA-like mice invites speculation about an exercise-induced ventilatory muscles maturation, as already reported in our laboratory with an exercise-induced acceleration of motor neuron maturation and improvement of the neuromuscular junction morphology in the hind limb muscles of SMA-like mice (Biondi *et al.* 2008).

Taken together, the present study provides evidence that the cardiomyopathy observed in SMA model mice is mainly due to intrinsic cardiac alteration but not autonomic impairment. More importantly, we found that physical exercise partially restores cardiac function in a severe type of SMA mice. This study and others are beginning to indicate a more profound involvement of cellular, structural and vascular cardiac dysfunction in the pathogenesis of SMA, widely opening alternative pharmacological and non-pharmacological therapeutic strategies that would most certainly include physical exercise.

References

- Adamcova M & Pelouch V (1999). Isoforms of troponin in normal and diseased myocardium. *Physiol Res* **48**, 235–247.
- Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC & Leinwand LA (2001). Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol* **90**, 1900–1908.
- Alpert NR, Brosseau C, Federico A, Krenz M, Robbins J & Warshaw DM (2002). Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H1446–H1454.
- Arai H, Tanabe Y, Hachiya Y, Otsuka E, Kumada S, Furushima W, Kohyama J, Yamashita S, Takanashi J & Kohno Y (2005). Finger cold-induced vasodilatation, sympathetic skin response, and R-R interval variation in patients with progressive spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* **20**, 871–875.
- Araujo Ade Q, Araujo M & Swoboda KJ (2009). Vascular perfusion abnormalities in infants with spinal muscular atrophy. *J Pediatr* **155**, 292–294.
- Bach JR (2007). Medical considerations of long-term survival of Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Phys Med Rehabil* **86**, 349–355.
- Bach JR (2012). Noninvasive respiratory management of high level spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* **35**, 72–80.
- Baudrie V, Laude D & Elghozi JL (2007). Optimal frequency ranges for extracting information on cardiovascular autonomic control from the blood pressure and pulse interval spectrograms in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R904–R912.
- Bernardi L, Porta C, Gabutti A, Spicuzza L & Sleight P (2001). Modulatory effects of respiration. *Auton Neurosci* **90**, 47–56.
- Berul CI, Christe ME, Aronovitz MJ, Seidman CE, Seidman JG & Mendelsohn ME (1997). Electrophysiological abnormalities and arrhythmias in alpha MHC mutant familial hypertrophic cardiomyopathy mice. *J Clin Invest* **99**, 570–576.
- Bevan AK, Hutchinson KR, Foust KD, Braun L, McGovern VL, Schmelzer L, Ward JG, Petruska JC, Lucchesi PA, Burghes AH & Kaspar BK (2010). Early heart failure in the SMNDelta7 model of spinal muscular atrophy and correction by postnatal scAAV9-SMN delivery. *Hum Mol Genet* **19**, 3895–3905.
- Billman GE (2002). Aerobic exercise conditioning: a nonpharmacological antiarrhythmic intervention. *J Appl Physiol* **92**, 446–454.
- Biondi O, Grondard C, Lecolle S, Deforges S, Pariset C, Lopes P, Cifuentes-Diaz C, Li H, della Gaspara B, Chanoine C & Charbonnier F (2008). Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* **28**, 953–962.
- Chai Y, Zhang DM & Lin YF (2011). Activation of cGMP-dependent protein kinase stimulates cardiac ATP-sensitive potassium channels via a ROS/calmodulin/CaMKII signaling cascade. *PLoS One* **6**, e18191.
- Cranefield PF, Wit AL & Hoffman BF (1972). Conduction of the cardiac impulse. 3. Characteristics of very slow conduction. *J Gen Physiol* **59**, 227–246.
- De Angelis K, Wichi RB, Jesus WR, Moreira ED, Morris M, Krieger EM & Irigoyen MC (2004). Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. *J Appl Physiol* **96**, 2174–2178.
- De Meersman RE (1993). Heart rate variability and aerobic fitness. *Am Heart J* **125**, 726–731.
- Dixon EM, Kamath MV, McCartney N & Fallen EL (1992). Neural regulation of heart rate variability in endurance athletes and sedentary controls. *Cardiovasc Res* **26**, 713–719.
- Drummond GB (2009). Reporting ethical matters in the Journal of Physiology: standards and advice. *J Physiol* **587**, 713–719.
- Eckberg DL (1997). Baroreflexes and the failing human heart. *Circulation* **96**, 4133–4137.
- El-Khodori BF, Edgar N, Chen A, Winberg ML, Joyce C, Brunner D, Suarez-Farinas M & Heyes MP (2008). Identification of a battery of tests for drug candidate evaluation in the SMNDelta7 neonate model of spinal muscular atrophy. *Exp Neurol* **212**, 29–43.
- Everett AW, Sinha AM, Umeda PK, Jakovcic S, Rabinowitz M & Zak R (1984). Regulation of myosin synthesis by thyroid hormone: relative change in the alpha- and beta-myosin heavy chain mRNA levels in rabbit heart. *Biochemistry* **23**, 1596–1599.

- Gardner PI, Ursell PC, Fenoglio JJ, Jr & Wit AL (1985). Electrophysiologic and anatomic basis for fractionated electrograms recorded from healed myocardial infarcts. *Circulation* **72**, 596–611.
- Grondard C, Biondi O, Armand AS, Lecolle S, Della Gaspera B, Pariset C, Li H, Gallien CL, Vidal PP, Chanoine C & Charbonnier F (2005). Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* **25**, 7615–7622.
- Hachiya Y, Arai H, Hayashi M, Kumada S, Furushima W, Ohtsuka E, Ito Y, Uchiyama A & Kurata K (2005). Autonomic dysfunction in cases of spinal muscular atrophy type 1 with long survival. *Brain Dev* **27**, 574–578.
- Hall GH (2008). Exercise ECGs in angina. Which “angiographic positives” will die from heart disease? *BMJ* **337**, a3100.
- Harada K, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y & Komuro I (1999). Angiotensin II type 1A receptor knockout mice display less left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction. *Circulation* **100**, 2093–2099.
- Hayano J & Yasuma F (2003). Hypothesis: respiratory sinus arrhythmia is an intrinsic resting function of cardiopulmonary system. *Cardiovasc Res* **58**, 1–9.
- Heier CR, Satta R, Lutz C & DiDonato CJ (2010). Arrhythmia and cardiac defects are a feature of spinal muscular atrophy model mice. *Hum Mol Genet* **19**, 3906–3918.
- Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH & Li H (2000). A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet* **24**, 66–70.
- Jones WK, Grupp IL, Doetschman T, Grupp G, Osinska H, Hewett TE, Boivin G, Gulick J, Ng WA & Robbins J (1996). Ablation of the murine alpha myosin heavy chain gene leads to dosage effects and functional deficits in the heart. *J Clin Invest* **98**, 1906–1917.
- Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, Leykekhman O, Lutz C, Arkovitz MS, Landmesser LT & Monani UR (2008). Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*.
- Kong L, Wang X, Choe DW, Polley M, Burnett BG, Bosch-Marce M, Griffin JW, Rich MM & Sumner CJ (2009). Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* **29**, 842–851.
- Kostova FV, Williams VC, Heemskerk J, Iannaccone S, Didonato C, Swoboda K & Maria BL (2007). Spinal muscular atrophy: classification, diagnosis, management, pathogenesis, and future research directions. *J Child Neurol* **22**, 926–945.
- Krenz M, Sanbe A, Bouyer-Daloz F, Gulick J, Klevitsky R, Hewett TE, Osinska HE, Lorenz JN, Brosseau C, Federico A, Alpert NR, Warshaw DM, Perryman MB, Helmke SM & Robbins J (2003). Analysis of myosin heavy chain functionality in the heart. *J Biol Chem* **278**, 17,466–17,474.
- Lompre AM, Nadal-Ginard B & Mahdavi V (1984). Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem* **259**, 6437–6446.
- Martinez-Hernandez R, Soler-Botija C, Also E, Alias L, Caselles L, Gich I, Bernal S & Tizzano EF (2009). The developmental pattern of myotubes in spinal muscular atrophy indicates prenatal delay of muscle maturation. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**, 474–481.
- McGovern VL, Gavrillina TO, Beattie CE & Burghes AH (2008). Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse. *Hum Mol Genet*.
- Michaud M, Arnoux T, Bielli S, Durand E, Rotrou Y, Jablonka S, Robert F, Giraudon-Paoli M, Riessland M, Mattei MG, Andriambeloson E, Wirth B, Sendtner M, Gallego J, Pruss RM & Bordet T (2010). Neuromuscular defects and breathing disorders in a new mouse model of spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* **38**, 125–135.
- Mitchell GF, Jeron A & Koren G (1998). Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **274**, H747–H751.
- Nguyen L, Chung J, Lam L, Tsoutsman T & Semsarian C (2007). Abnormal cardiac response to exercise in a murine model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* **119**, 245–248.
- Niskanen JP, Tarvainen MP, Ranta-Aho PO & Karjalainen PA (2004). Software for advanced HRV analysis. *Comput Methods Programs Biomed* **76**, 73–81.
- Oskoui M & Kaufmann P (2008). Spinal muscular atrophy. *Neurotherapeutics* **5**, 499–506.
- Samaha FJ, Buncher CR, Russman BS, White ML, Iannaccone ST, Barker L, Burhans K, Smith C, Perkins B & Zimmerman L (1994). Pulmonary function in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* **9**, 326–329.
- Sato S (2008). Quantitative evaluation of ontogenetic change in heart rate and its autonomic regulation in newborn mice with the use of a noninvasive piezoelectric sensor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H1708–H1715.
- Shababi M, Habibi J, Yang HT, Vale SM, Sewell WA & Lorson CL (2010). Cardiac defects contribute to the pathology of spinal muscular atrophy models. *Hum Mol Genet* **19**, 4059–4071.
- Smith ML, Hudson DL, Graitzer HM & Raven PB (1989). Exercise training bradycardia: the role of autonomic balance. *Med Sci Sports Exerc* **21**, 40–44.
- Stoica P & Moses RL (1997). Introduction to Spectral Analysis. Prentice Hall, New Jersey, ISBN: 0-13-258419-0.
- Sveen ML, Jeppesen TD, Hauerslev S, Kober L, Krag TO & Vissing J (2008). Endurance training improves fitness and strength in patients with Becker muscular dystrophy. *Brain* **131**, 2824–2831.
- Swoap SJ, Li C, Wess J, Parsons AD, Williams TD & Overton JM (2008). Vagal tone dominates autonomic control of mouse heart rate at thermoneutrality. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H1581–H1588.
- Task Force (1996). Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Eur Heart J* **17**, 354–381.
- Thireau J, Zhang BL, Poisson D & Babuty D (2008). Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide. *Exp Physiol* **93**, 83–94.

- Towbin H, Schoenenberger C, Ball R, Braun DG & Rosenfelder G (1984). Glycosphingolipid-blotting: an immunological detection procedure after separation by thin layer chromatography. *J Immunol Methods* **72**, 471–479.
- Tsoutsman T, Bagnall RD & Semsarian C (2008). Impact of multiple gene mutations in determining the severity of cardiomyopathy and heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35**, 1349–1357.
- Tsoutsman T, Chung J, Doolan A, Nguyen L, Williams IA, Tu E, Lam L, Bailey CG, Rasko JE, Allen DG & Semsarian C (2006). Molecular insights from a novel cardiac troponin I mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* **41**, 623–632.
- Yotsukura M, Fujii K, Katayama A, Tomono Y, Ando H, Sakata K, Ishihara T & Ishikawa K (1998). Nine-year follow-up study of heart rate variability in patients with Duchenne-type progressive muscular dystrophy. *Am Heart J* **136**, 289–296.

Author contributions

O.B. and P.L. conducted, designed and analysed the majority of the experiments, and partly wrote the manuscript. C.D. and

J.B. conducted the Western blot experiments. F.C. and A.B.S. helped with the exercise programme and in the analysis of cardiac muscle data. C.D., C.C. and C.P. assisted in the majority of experiments, and C.P. helped in writing the manuscript. F.C. supervised the project and partly wrote the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements

All the authors wish to thank Hung Li for his fruitful collaboration over the past years. We thank S. Besse, C.-L. Gallien, D. Laude and V. Baudrie for their comments and advice. J.B. is the recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie. F.C. is the recipient of a fellowship from AXA Research and Garches Foundation. This work was supported by a grant from the AFM (Association Française contre les Myopathies). The authors have no conflict of interest to declare.

Conclusions de l'article 6

Cet article met en évidence que la cardiomyopathie observée chez les modèles murins mimant la SMA est principalement due à une altération cardiaque intrinsèque et non pas à un dysfonctionnement du système nerveux autonome.

Nous avons observé, dans un premier temps, une altération prononcée de la conduction électrique intracardiaque conduisant à une bradycardie et arythmie chez les souris mimant la SMA de type II. Ainsi, à P6, la fréquence cardiaque des souris contrôles est de 525 ± 22 battements/min et celle des souris mimant la SMA de 384 ± 28 battements/min. Ce phénomène est principalement dû à l'augmentation de la durée de la conduction cardiaque chez les souris mimant la SMA. A P12, l'effet s'accroît une fréquence cardiaque de 602 ± 44 battements/min pour les souris contrôles et 302 ± 64 battements/min pour les souris malades. Parallèlement, on observe un phénomène analogue avec le système respiratoire. A P6, la fréquence respiratoire des souris contrôles est de 177 ± 52 respirations/min et celle des souris mimant la SMA de 154 ± 16 respirations/min ; à P12, 262 ± 42 respirations/min et 120 ± 24 respirations/min, respectivement.

Dans un second temps, nous avons constaté sur les coupes histologiques de cœur en diastole que les ventricules des souris mimant la SMA semblaient atrophiés. La surface des ventricules est diminuée de 50%, ce qui est totalement corrélé avec la baisse de poids du cœur de 50% et de l'organisme de 40%. Par ailleurs, les cardiomyocytes chez les souris mimant la SMA apparaissent désorganisés, ronds, isolés et atrophiés. Le septum intraventriculaire et les parois ventriculaires sont plus fines chez les souris malades que chez les souris contrôles. Nous avons également noté une fibrose ventriculaire étendue chez les souris mimant la SMA.

Enfin, dans un troisième temps, nous n'avons pas observé chez les souris mimant la SMA le remplacement des troponines squelettiques par les troponines cardiaques, ni le remplacement des transcrits β des chaînes lourdes de la myosine par des transcrits α durant la période postnatale comme chez les souris contrôles. Par conséquent, nous avons conclu qu'il existait également un retard de maturation du muscle cardiaque chez ces souris.

En revanche, nous avons démontré que le système sympathique cardiaque des souris mimant la SMA de type II était non-pathologique et contrecarrait, vraisemblablement, les altérations dramatiques de la fonction cardiaque, telles l'arythmie et la bradycardie.

De plus, nous avons prouvé, pour la première fois que l'exercice physique corrigeait, en partie, les altérations cardiaques des souris mimant la SMA de type II. En effet, un exercice d'intensité modéré quotidien, améliore l'efficacité de la conduction électrique intracardiaque, prévient la fibrose, atténue les défauts d'expression des protéines cardiaques et diminue les phénomènes de bradycardie et d'arythmie. L'ensemble de ces résultats indique que la pathogenèse de la SMA est également liée à un dysfonctionnement cardiaque cellulaire, structurel et vasculaire.

RÉSUMÉ

L'amyotrophie spinale infantile (SMA) est une maladie génétique autosomique récessive de l'enfant pour laquelle aucun traitement efficace n'existe. La SMA est caractérisée par la perte spécifique des motoneurones spinaux conduisant à une faiblesse musculaire sévère. Le décès des patients survient lorsque les muscles vitaux sont touchés. Cette maladie est causée par la mutation du gène Survival of Motor Neuron 1 (*Smn1*) conduisant à une diminution importante de l'expression de la protéine Survival of Motor Neuron (SMN). Tous les patients possèdent un ou plusieurs gènes copie de *Smn1*, le gène *Smn2*. Ces copies modulent la sévérité de la maladie en produisant une faible quantité de transcrits SMN complets, en particulier possédant l'exon 7, un exon alternatif qui code pour un domaine important pour que la protéine SMN soit fonctionnelle et stable.

Des résultats récents, obtenus au laboratoire, indiquent que l'exercice physique retarde la mort des motoneurones, conduit à une augmentation du taux de maturation postnatale des unités motrices et déclenche l'expression du gène *Smn2* chez des souris mimant la SMA de type II. Les premières données moléculaires suggèrent que les effets de l'exercice physique pourraient être relayés par la signalisation dépendante 1) des récepteurs au NMDA (Biondi et coll., *J Neurosci*, 2008) et/ou 2) du récepteur à IGF-1.

Dans notre étude, nous avons d'abord testé les effets de l'activation directe des récepteurs au NMDA (NMDAR) dans un contexte de SMA. Nous montrons qu'une activation adéquate de ces récepteurs dans plusieurs modèles souris mimant les SMA sévères accélère la maturation postnatale des unités motrices, limite l'apoptose dans la moelle épinière et active l'expression du gène *Smn2* favorisant l'expression de la protéine SMN. Ces effets bénéfiques sont dépendants du niveau d'activation des NMDARs et suggèrent que l'accélération de la maturation postnatale des unités motrices, induite par le NMDA, est indépendante du niveau d'expression de la protéine SMN. De manière importante, l'activation pharmacologique des NMDARs augmente fortement la durée de vie de deux modèles différents de souris mimant la SMA de type sévère. L'analyse des cascades de signalisation intracellulaire a révélé une altération inattendue des profils d'activation des voies de signalisation ERK et AKT/CREB, qui se rééquilibrent quand les NMDARs sont activés (Branchu et coll., *J Neurosci*, 2010).

Comme la kinase ERK est constitutivement suractivée dans la moelle épinière des souris mimant la SMA, nous avons ensuite examiné son rôle potentiel dans la régulation de l'expression des gènes *Smn2*. Nous avons démontré que l'inhibition pharmacologique de la voie de signalisation MEK/ERK/Elk-1, notamment avec un médicament anti-cancéreux actuellement en essai clinique de phase 2, est bénéfique pour les souris mimant la SMA de type I. Nous avons identifié une relation croisée entre les voies de signalisation ERK et AKT impliquant la modulation, calcium-dépendante, de l'activité CaMKII. Ainsi, l'inhibition pharmacologique de ERK durant la phase symptomatique de la maladie chez ces souris, entraîne l'activation de la voie CaMKII/AKT/CREB et conduit à une augmentation significative de l'expression de la protéine SMN dans les motoneurones suite à une augmentation de la transcription du gène *Smn2*. Ces modifications sont corrélées avec une augmentation remarquable de la durée de vie et de la mobilité des souris et une neuroprotection des motoneurones spinaux. De plus, l'inhibition de ERK dans des cellules musculaires différenciées provenant de patients atteints de SMA de type II induit également une augmentation de l'activité de la voie AKT/CREB et de l'expression de SMN (Branchu et coll., *J Neurosci*, en révision positive).

Enfin, nous avons montré que l'exercice physique est capable de diminuer l'expression du récepteur à l'IGF-1 (IGF-1R), qui est surexprimé dans la moelle épinière des souris mimant la SMA sévère. Nous avons constaté que cette réduction est corrélée avec une réactivation de la voie AKT/CREB et une inhibition de la voie MEK/ERK/Elk-1. Afin d'étudier le lien fonctionnel entre le niveau d'expression d'IGF-1R et le profil d'activation des voies de signalisations intracellulaires dans un contexte de SMA, nous avons développé un modèle de souris mimant la SMA et invalidé partiellement pour IGF-1R (souris SMA/IGF-1R^{+/-}). Nous avons démontré que la réduction du niveau d'expression d'IGF-1R était neuroprotecteur, accélérerait le taux de maturation postnatale des unités motrices et conduisait à une augmentation remarquable de la durée de vie des souris SMA. L'analyse des cascades de signalisation intracellulaire dans la moelle épinière des souris SMA/IGF-1R^{+/-} a révélé une activation de la voie AKT/CREB, indépendante du calcium, corrélée à une chute de l'activation de la voie ERK et résultant en une augmentation importante de l'expression de la protéine SMN (Publication en préparation).